

PENGARUH MEDIUM LIMBAH ORGANIK TERHADAP  
AKTIVITAS ENZIM LIPASE DARI ISOLAT KAPANG  
TANAH WONOREJO

**Nama Mahasiswa** : Alfia Rahma Kurniawati  
**NRP** : 1510 100 020  
**Jurusan** : Biologi  
**Dosen Pembimbing** : N. D. Kuswytasari, S.Si., M.Si.

*Abstrak*

*Meningkatnya akumulasi limbah cair organik yang mengandung lipid di lingkungan perlu ditanggulangi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim yang dihasilkan dari isolat kapang Mortierella sp. T3.G1, Aspergillus niger T2.1, Penicillium sp.1 T4.E3 secara tunggal dan konsorsium dalam mendegradasi lipid pada medium limbah organik yang berbeda.*

*Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah nilai degradasi lipid dan nilai aktivitas enzim lipase. Limbah cair organik yang digunakan adalah limbah cair pencucian ikan, limbah cair tangki septik dan limbah minyak goreng bekas. Data pengaruh medium limbah cair organik terhadap aktivitas enzim lipase dianalisis dengan menggunakan ANOVA oneway dan dilanjutkan dengan uji Duncan.*

*Hasil menunjukkan bahwa medium dan isolat berpengaruh terhadap aktivitas lipase dengan nilai  $P=0,000$ . Korelasi nilai aktivitas dan nilai degradasi tertinggi ditunjukkan pada penambahan isolat Aspergillus niger dengan nilai aktivitas lipase sebesar 0,1511 U/mL dan degradasi lipid 83,95% pada limbah minyak goreng bekas, 0,0997 U/mL dan degradasi lipid 58,43% pada limbah pencucian ikan dan aktivitas lipase 0,0697 U/mL dan degradasi lipid 67,36% pada limbah tangki septik.*

*Kata kunci : Limbah Organik, Lipase, Degradasi Lipid*

THE INFLUENCE OF ORGANIC WASTE SUBSTRATE  
AGAINST THE ACTIVITY OF LYPASE ENZYME FROM  
WONOREJO MOLDS ISOLATE

**Student Name** : Alfia Rahma Kurniawati  
**NRP** : 1510 100 020  
**Departement** : Biologi  
**Supervisor** : N. D. Kuswyasari, S.Si., M.Si.

**Abstract**

Increasing the accumulation of organic waste liquid that containing lipids in the neighborhood need to overcome. This research is aimed to know the activity of an enzyme lipase from mold isolate *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1, and *Penicillium* sp.1 T4.E3 singly and a consortium on different medium liquid waste organic.

The parameters that are tested in this research is the degradation of lipid and the activity of an enzyme lipase. Organic waste liquid that used there are processing fish wastewater, septic tank wastewater and used cooking waste oil. The influence data of medium against the activity of an enzyme protease analyzed using Annova One-Way and continued with Duncan test.

The result showed that medium and isolates affecting the activity of enzymes lipase with P value=0,000. Correlation of activity value and degradation value indicated that isolate *Aspergillus niger* is the highest in three organic waste liquid with activity lipase 0,0997 U/mL and degradation lipid 58,43 % on processing fish wastewater, activity lipase 0,1511 U/mL and degradation lipid 83,95 % on used cooking waste oil and lipase 0,0697 U/mL and degradation lipid 67,36 % on septic tank wastewater.

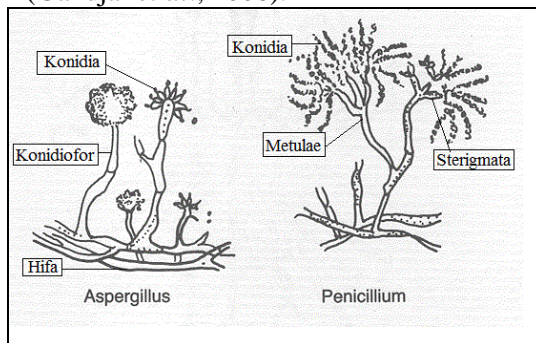
**Keywords** : Lipase, Lipid Degradation, Organic Waste,

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kapang

Kapang (*molds*) adalah jamur berfilamen. Disebut berfilamen karena memiliki struktur hifa yang menyerupai benang (*filament*). Perbedaannya dengan khamir adalah kapang berupa multiseluler sedangkan khamir uniseluler. Kapang berbeda dengan cendawan karena walaupun sama-sama multiselular, cendawan dapat membentuk tubuh buah (*fruiting body*) dan dapat dilihat secara kasat mata (Brock *et al.*, 1994).

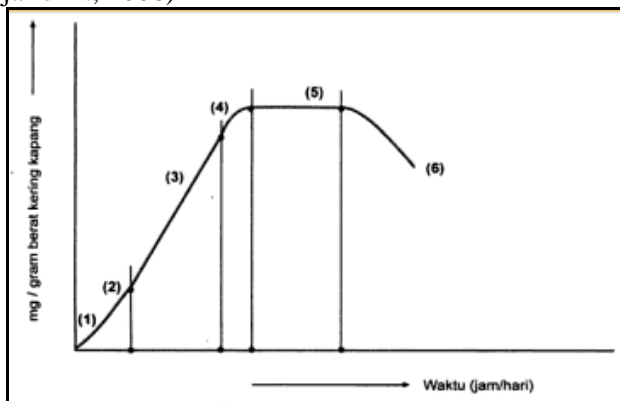
Bagian tubuh kapang yang paling menyolok adalah miselium yang terbentuk dari kumpulan hifa yang bercabang-cabang membentuk suatu jala yang umumnya berwarna putih. Hifa berisi protoplasma yang dikelilingi oleh suatu dinding yang kuat. Pertumbuhan hifa berlangsung terus-menerus di bagian apikal, sehingga panjangnya tidak dapat ditentukan secara pasti. Diameter hifa umumnya tetap, yaitu berkisar 3-30  $\mu\text{m}$ . Contoh spesies dari kapang diantaranya adalah *Aspergillus* dan *Penicillium* (Gambar 2.1). Dinding sel kapang sangat kokoh dan resisten terhadap serangan enzim, suatu hal yang menguntungkan bagi kapang karena hifa dapat terus menembus tanah dan aneka substrat lain (Gandjar *et al.*, 2006).



Gambar 2.1 Struktur *Aspergillus* dan *Penicillium* (Gambar dimodifikasi dari Webster and Weber, 2007).

Fisiologi kapang mengacu pada metabolisme pertumbuhan gizi, reproduksi dan kematian sel kapang. Hal ini juga umumnya berkaitan dengan lingkungan biotik dan abiotik. Khamir dan kapang memiliki kebutuhan gizi yang relatif sederhana dan spesies yang paling dapat bertahan dengan baik dalam kondisi aerobik jika disertakan dengan glukosa, garam amonium, ion anorganik dan beberapa faktor pertumbuhan. Makronutrien dibutuhkan pada konsentrasi milimolar, terdiri dari sumber karbon, nitrogen, oksigen, belerang, fosfor, kalium dan magnesium. Sedangkan mikronutrien dibutuhkan pada konsentrasi mikromolar, terdiri dari elemen seperti kalsium, tembaga, besi, mangan dan seng yang akan diperlukan bagi pertumbuhan sel kapang (Kavanagh, 2005).

Ketika khamir atau kapang diinokulasikan ke dalam media nutrisi dan diinkubasi di bawah kondisi optimal untuk pertumbuhan fisik, kurva pertumbuhan yang khas akan dihasilkan (Kavanagh, 2005). Kurva tersebut dapat diperoleh dari menghitung massa sel pada kapang atau kekeruhan media pada khamir dalam waktu tertentu. Kurva pertumbuhan mempunyai beberapa fase (fase pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar 2.2) (Gandjar dkk., 2006)



Gambar 2.2 Kurva Pertumbuhan Kapang (1) fase lag: (2) fase akselerasi: (3) fase eksponensial: (4) fase deselerasi: (5) fase stasioner: (6) fase kematian dipercepat (Gandjar dkk., 2006)

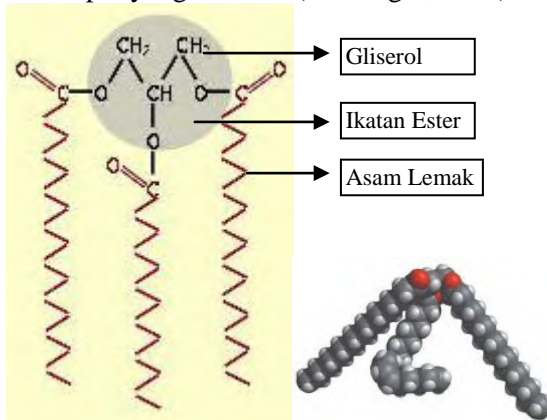
Fase lag, yaitu fase penyesuaian sel-sel dengan lingkungan, pembentukan enzim-enzim untuk pengurai substrat (Gandjar, dkk., 2006). Fase akselerasi, yaitu fase mulainya sel-sel membelah dan fase lag menjadi fase aktif. Fase eksponensial, merupakan fase perbanyakan jumlah sel yang sangat banyak, aktivitas sel sangat meningkat dan fase ini merupakan fase penting dalam kehidupan kapang. Enzim-enzim yang dihasilkan dapat dipanen pada awal fase eksponensial. Fase deselerasi atau akhir dari fase eksponensial, merupakan waktu sel-sel mulai kurang aktif membelah, biomassa sel atau senyawa-senyawa yang tidak lagi diperlukan oleh sel-sel dapat dipanen pada fase ini. Fase stasioner merupakan fase dimana jumlah sel yang bertambah dengan jumlah sel yang mati relatif seimbang. Kurva pada fase ini merupakan garis lurus yang horizontal. Banyak senyawa metabolit sekunder yang dapat dipanen pada fase stasioner. Selanjutnya pada fase kematian dipercepat, jumlah sel-sel yang mati atau tidak aktif sama sekali lebih banyak daripada sel-sel yang masih hidup (Gandjar dkk., 2006).

## **2.2 Lipid**

Lipid adalah senyawa organik berminyak atau berlemak yang tidak larut dalam air, yang dapat diekstrak dari sel dan jaringan oleh pelarut nonpolar, seperti kloroform atau ester. Jenis lipid yang paling banyak adalah lemak atau trigliserida, yang merupakan bahan bakar utama hampir semua organisme. Terdapat beberapa kelas lipid, masing – masing memiliki fungsi biologi spesifik (Lehninger, 2004).

Asam lemak merupakan komponen utama unit pembangun yang khas pada kebanyakan lipid. Asam lemak adalah asam organik berantai panjang yang mempunyai atom karbon dari 4 sampai 36 ( $C_4$  hingga  $C_{36}$ ). Asam lemak memiliki gugus karboksil tunggal dan ekor hidrokarbon nonpolar panjang yang menyebabkan kebanyakan lipid bersifat tidak larut dalam air dan tampak berminyak atau berlemak. Asam lemak tidak terdapat secara bebas atau berbentuk tunggal di dalam sel atau jaringan,

tetapi terdapat dalam bentuk yang terikat secara kovalen pada berbagai kelas lipid yang berbeda (Lehninger, 2004).



Gambar 2.3 Struktur Kimia Trigliserida ( Lehninger, 2004)

Lipid yang paling sederhana dan yang paling banyak mengandung asam lemak sebagai unit penyusun adalah trigliserida juga seringkali dinamakan lemak, lemak netral atau trigliserat. Trigliserida adalah ester dari alkohol gliserol dengan tiga molekul asam lemak (Ilustrasi struktur trigliserida pada Gambar 2.3). Trigliserida adalah molekul hidrofobik nonpolar, karena molekul ini tidak mengandung muatan listrik atau gugus fungsional dengan polaritas tinggi (Lehninger, 2004).

Trigliserida terdapat dalam berbagai jenis, tergantung pada identitas dan letak ketiga komponen asam lemak yang terikat dengan ikatan ester oleh gliserol. Senyawa yang mengandung satu jenis asam lemak pada ketiga posisi disebut trigliserida sederhana. Golongan ini dinamakan menurut asam lemak yang terkandung. Contohnya tripalmitolgliserol dan trioleilgliserol, yang mengandung asam palmitat dan asam oleat berturut-turut. Trigliserida yang mengandung dua atau lebih asam lemak yang berbeda disebut trigliserida campuran. Kebanyakan lemak alami seperti minyak zaitun, mentega dan lemak makanan lainnya merupakan campuran dari trigliserida sederhana dan campuran

yang mengandung berbagai jenis asam lemak yang berbeda panjang rantai dan derajat kejenuhan (Lehninger, 2004).

Pada minyak zaitun, asam lemak terikat dalam trigliserida. Trigliserida dapat kehilangan satu asam lemak, sehingga menjadi digliserida, atau jika kehilangan dua asam lemak, akan menjadi monogliserida (Mailer, 2006). Asam lemak dapat dibebaskan dari ikatan ini oleh hidrolisis kimia atau enzimatis (Lehninger, 2004). Asam lemak yang lepas dari trigliserida kemudian disebut asam lemak bebas. Rantai karbon dalam asam lemak bebas dapat memiliki panjang yang berbeda, dan mungkin juga termasuk dalam asam lemak jenuh, asam lemak tak jenuh tunggal, atau asam lemak tak jenuh ganda. Sekitar 95-98% dari minyak zaitun merupakan trigliserida. Komponen yang paling penting dalam minyak zaitun adalah asam lemak (Mailer, 2006).

### **2.2.1 Lipid didalam limbah organik**

Lipid terbagi dalam kelompok minyak dan lemak dimana minyak dan lemak merupakan senyawa organik yang terdapat di alam serta tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik non-polar, misalnya dietil eter ( $C_2H_5OC_2H_5$ ), Kloroform ( $CHCl_3$ ), benzena dan hidrokarbon lainnya, lemak dan minyak dapat larut dalam pelarut yang disebutkan di atas karena lemak dan minyak mempunyai polaritas yang sama dengan pelarut tersebut (Sugiharto, 1987).

Minyak dan lemak digunakan sebagai komponen utama bahan makanan yang juga banyak didapat di dalam air limbah. Kandungan zat minyak dan lemak dapat ditentukan melalui contoh air limbah dengan heksana. Minyak dan lemak membentuk ester dan alkohol. Lemak tergolong pada bahan organik yang tetap dan tidak mudah untuk diuraikan oleh bakteri. Terbentuknya emulsi air dalam minyak akan membuat lapisan yang menutupi permukaan air dan dapat merugikan, karena penetrasi sinar matahari ke dalam air berkurang serta lapisan minyak menghambat pengambilan oksigen dari udara. Kadar maksimal minyak dan lemak pada air sungai adalah 1 mg/L.

Minyak dapat sampai ke saluran air limbah, sebagian besar minyak ini mengapung di dalam air limbah, akan tetapi ada juga yang mengendap terbawa oleh lumpur. Pada pengolahan air limbah, efek buruk yang dapat menimbulkan permasalahan yaitu pada saluran air limbah dan pada bangunan pengolahan (Sugiharto, 1987).

### **2.2.2 Metabolisme lipid pada kapang**

Kapang adalah mikroorganisme heterotrof karena tidak memiliki kemampuan untuk mengoksidasi senyawa karbon anorganik atau senyawa karbon yang memiliki satu karbon. Senyawa karbon organik yang dapat dimanfaatkan kapang untuk membuat materi sel baru berkisar dari molekul sederhana seperti gula sederhana, asam organik gula terikat alkohol, polimer rantai pendek dan rantai panjang mengandung karbon, hingga kepada senyawa kompleks seperti karbohidrat, protein, lipid dan asam nukleat. Kapang dapat menggunakan lipid sebagai sumber karbon. Hidrolisis lipid memerlukan kerja enzim lipase dan mengubahnya menjadi diasilgliserol, monoasilgliserol, gliserol atau asam lemak (Gandjar *dkk.*, 2006).

Lipid adalah energi cadangan kedua setelah karbohidrat. Lipid akan digunakan sebagai sumber karbon setelah kebutuhan sumber karbon yang berasal dari kelompok karbohidrat telah habis. Beberapa kapang menghasilkan lipase ekstraseluler dan fosfolipase yang menghidrolisis lipid dan fosfolipid menghasilkan gliserol dan asam lemak yang kemudian dapat berasimilasi (Carlile *et al.*, 2001). Kapang memiliki model absorpsi nutrisi, mensekresikan enzim ke lingkungan yang memecah makromolekul menjadi substansi yang lebih sederhana kemudian zat tersebut masuk ke dalam sel melalui osmosis atau mekanisme transport khusus (Moore, 1972). Ketika sel melakukan metabolisme, nutrisi akan diubah ke dalam bentuk materi sel, energi dan produk buangan (Gandjar *dkk.*, 2006).



## 2.3 Enzim Lipase

Enzim adalah protein yang mengkatalisa reaksi kimiawi spesifik. Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Enzim bekerja dengan urutan yang teratur, enzim mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrien, reaksi yang menyimpan dan mengubah energi kimiawi, dan yang membuat makromolekul sel dari prekursor sederhana. Spesifitas enzim amat tinggi terhadap substratnya, enzim mempercepat reaksi kimiawi spesifik tanpa pembentukan produk samping. Enzim mengikat molekul substrat membentuk kompleks enzim-substrat yang bersifat sementara, yang terurai membentuk enzim bebas dan produknya (Lehninger, 2004).

Lipase disebut juga triasilgliserol hidrolase (E.C.3.1.1.3), merupakan enzim yang dapat menjadi biokatalis pada reaksi hidrolisis triasilgliserol menjadi gliserol dan asam lemak. Enzim lipase membutuhkan substrat khusus. Kekhususan ini menjadi faktor pertimbangan utama dalam analisa dan aplikasinya. Berdasarkan jenis substrat, lipase digolongkan menjadi beberapa jenis yaitu kekhususan posisi pada asam lemak, alkohol, asilgliserol, stereo dan kiral (Long, 2009).

Posisi lipase mempunyai kekhususan aktivitas yaitu pada posisi 1 dan 3 asilgliserol. Lipase alkohol merupakan jenis yang dapat bekerja pada lingkungan dengan kandungan solven organik seperti alkohol atau senyawa fungsional yang lain. Lipase asilgliserol mempunyai aktivitas berbeda jika substrat berbeda (triasilgliserol, diasilgliserol atau monoasilgliserol). Lipase stereo merupakan enzim dengan kemampuan membedakan posisi Sn-1 dan Sn-3 pada triasilgliserol. Jenis yang terakhir ini sangat penting untuk membuat isomer kiral murni yang dipergunakan sebagai intermediet obat (Long, 2009).

### 2.3.1 Manfaat enzim lipase

Lipase (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang ada dimana mana dan berpotensi pada sektor industri (Sharma *et al.*, 2001). Lipase merupakan jenis

enzim yang tidak larut dalam air yang mengkatalisi proses hidrolisis dari ikatan ester pada substrat lipid, seperti triasilgliserol (TAGs) yang melepaskan rantai panjang asam lemak. Terlepas dari hidrolisis, lipase memberikan jarak yang lebar dari reaksi konversi yang termasuk interesterifikasi, alkoholisis dan amonilisis. Karakteristik unit dari lipase termasuk spesifitas substrat, stereospesifitas, regiospesifitas dan kemampuan untuk mengkatalisis reaksi heterogen pada pertemuan antara sistem dapat larut air dan system tak larut air (Savitha *et al.*, 2007). Lipase dan esterase telah dikenal sebagai biokatalis yang bermanfaat dalam industry farmasi, tekstil, makanan, medis dan industry kimia (Mohan *et al.*, 2008).

## 2.4 Kapang Penghasil Enzim Lipase

Kapang adalah penghasil enzim yang diproduksi secara ekstraseluler. Produksi lipase oleh kapang dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya, pH, suhu, sumber karbon dan sumber nitrogen (Rani and Panneerselvam, 2009). Lipase ekstraseluler telah dikenal sebagai biokatalis yang selektif dan efisien pada beberapa industri misalnya biosensor, kimia, farmasi, pestisida makanan, kosmetik dan detergen (Pera, *et al.*, 2006).

Lipase diproduksi oleh banyak mikroorganisme dan eukariota tingkat tinggi. Kebanyakan lipase komersial berasal dari mikroorganisme. Mikroorganisme penghasil lipase telah ditemukan di habitat yang berbeda-beda seperti pada limbah industri, pabrik pengolah minyak nabati, peternakan, tanah yang tercemar minyak, minyak biji, makanan yang membusuk, timbunan kompos dan sumber air panas (Sharma *et al.*, 2001).

Beberapa kapang penghasil lipase adalah *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Penicillium cyclopium*, *Mucor michei*, *Ashhya gossypii*, *Geotrichum candidum*, *Beauveria bassiana*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizomucor michei*, *Fusarium oxysporum*, *Acremonium stricum*, *Alternaria brassicicola*, *Eurotrium herbanorium* dan *Ophiostoma piliferum*. Beberapa lipase dari kapang yang tersedia secara

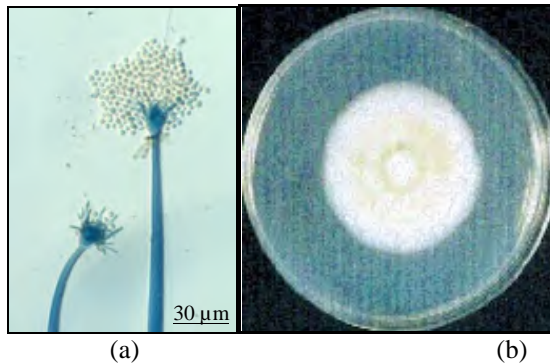
komersial adalah *Thermomyces lanuginosus* diproduksi oleh *Boehringer Mannheim*, *Novo Nordisk*; *Rhizomucor michei* diproduksi oleh *Novo Nordisk*, *Biocatalyst*, *Amano* (Sharma *et al.*, 2001).

#### **2.4.1 Genus Mortierella**

Genus Mortierella telah ditempatkan pada famili yang berbeda yakni Mortierellaceae dan telah dikarakterisasi dengan memiliki warna abu-abu hingga abu-abu kekuningan. Koloni genus Mortierella ini dapat tumbuh dengan cepat dengan memproduksi sporangia kecil dan halus yang melekat dengan kolumela pada sporangiofor yang sederhana atau bercabang (Ellis, 2011). Penampakan Mortierella secara makroskopis dan mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 2.4.

Mortierella tersebar secara luas, terutama pada hutan asam dan tanah kultivasi (Domsch *et al.*, 1993). Kapang ini dapat mengakumulasi lipid dalam jumlah besar utamanya dalam bentuk triacylglycerol (Ratledge, 1984).

Menurut penelitian Gaspar *et al.*, 1999, menyebutkan bahwa Mortierella menghasilkan enzim lipase ekstraselular. Aktivitas lipase dipengaruhi oleh kondisi kultur pada produksi enzim. Medium basal yang mengandung minyak zaitun dan Tween-80 mampu meningkatkan produksi lipase. Adanya  $\text{Fe}^{2+}$  dan  $\text{Ag}^{2+}$  selama reaksi dapat menghambat lipolisis, sedangkan  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  dapat menstimulasi aktivitas. Penambahan etil asetat, n-hexane, aseton atau n-butanol pada konsentrasi hingga 10% v/v mampu meningkatkan tingkat hidrolisis triolein.



Gambar 2.4 *Mortierella* (a) secara Mikroskopis dan (b) secara Makroskopis (Kuswytasari *et al.*, 2011).

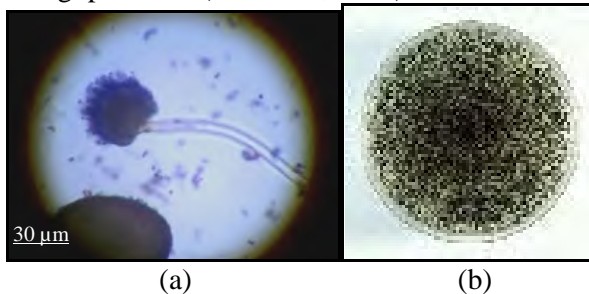
### 2.4.2 Genus *Aspergillus*

Genus *Aspergillus* dicirikan dengan adanya vesikel. Pada konidia tetap melekat satu sama lain oleh sebuah penghubung yang mungkin mencolok atau hampir tak terlihat. Koloni biasanya tumbuh dengan tak terlihat dan tumbuh dengan cepat, berbentuk seperti bubuk, berwarna putih, hijau kekuningan coklat ataupun hitam. Pada umumnya spesies dari *Aspergillus* bereproduksi secara aseksual. Spesies dari *Aspergillus* memainkan peranan penting pada siklus karbon dan nitrogen. *Aspergillus* dapat mendegradasi sejumlah komponen organik, gula, asam lemak, protein, selulosa, pektin dan xylan (Gugnani, 2003). Penampakan *Aspergillus* secara makroskopis dan mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 2.5.

*Aspergillus niger* dapat tumbuh optimum pada suhu 35-37°C, dengan suhu minimum 6-8°C, dan suhu maksimum 45-47°C. Selain itu, dalam proses pertumbuhannya fungi ini memerlukan oksigen yang cukup (aerobik). *Aspergillus niger* memiliki warna dasar berwarna putih atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam (Kamini *et al.*, 1998)

Kapang *Aspergillus niger* merupakan salah satu sumber penghasil enzim lipase. *Aspergillus niger* merupakan mikroba

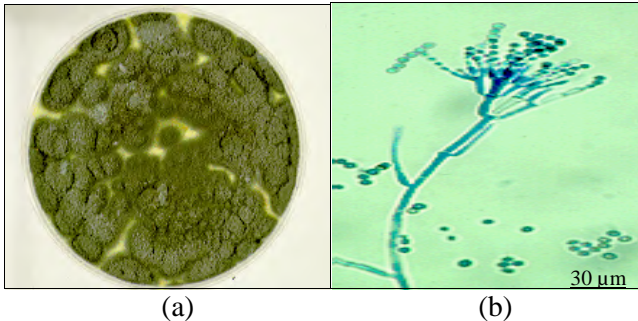
jenis kapang yang dapat tumbuh cepat dan tidak membahayakan karena tidak menghasilkan mikotoksin. Selain itu, penggunaannya mudah karena banyak digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat dan beberapa enzim seperti amilase, pektinase, amilo-glukosidase dan selulase. *Aspergillus niger* memiliki daya amilolitik dan proteolitik yang cukup baik, serta dapat menghasilkan enzim fitase ekstraselluler. Hasil fermentasinya dapat digunakan sebagai sumber protein sel tunggal (PST) dan media biakannya sebagai sumber energi potensial (Pera *et al*, 2006).



Gambar 2.5 *Aspergillus niger* (a) secara Mikroskopis dan (b) secara Makroskopis (Kuswytasari *et al.*, 2011).

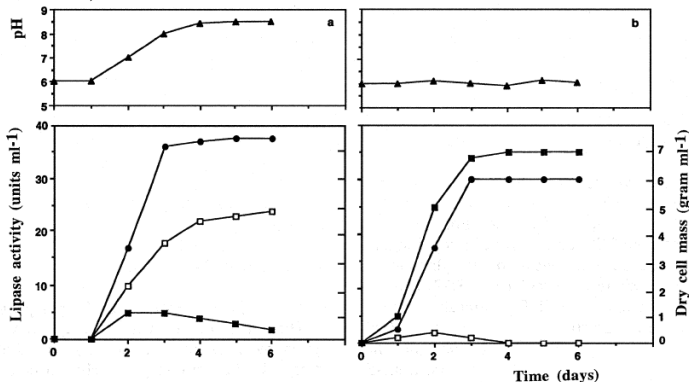
### 2.4.3 Genus *Penicillium*

Koloni *penicillium* biasanya tumbuh dengan cepat, berwarna hijau, terkadang putih, kebanyakan terdiri dari konidiofor yang tebal. Banyak spesies *penicillium* merupakan kontaminan yang umum pada bermacam substrat dan dikenal sebagai penghasil mycotoxin potensial (Ellis, 2011). Ciri-ciri spesifik genus *Penicillium* adalah mempunyai hifa bersepta, konidia, sterigma dan konidiospora dengan kepala yang membawa spora berbentuk seperti sapu dengan sterigma muncul dalam berkelompok dan konidia membentuk rantai. Penampakan *Penicillium* secara makroskopis dan mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 *Penicillium* (a) secara Mikroskopis dan (b) secara Mikroskopis (Kuswytasari *et al.*, 2011).

*Penicillium cyclopium* yang tumbuh pada fase stationer mampu memproduksi enzim lipase diantaranya lipase tipe I (tributylin) untuk triacylglycerol dan lipase tipe II (dicaprylin) untuk acyglycerol. Aktivitas lipase meningkat pada pH 7 pada suhu 70° C. Lipase menghidrolisis monoasilgliserol dan diasilgliserol sehingga menjadi asam lemak. Aktivitas lipase dari *Penicillium cyclopium* dapat dilihat pada Gambar 2.8 (Chahinian *et al.*, 2000).



Gambar 2.8 Produksi Lipase oleh *Penicillium cyclopium*. (a) *Penicillium cyclopium* pada ada (b) tidak adanya minyak zaitun(■) Aktivitas tributyrin (□) aktivitas dicaprylin (●) massa miselium (Chahinian *et al.*, 2000).

## 2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Lipase

Produksi lipase dipengaruhi oleh jenis, konsentrasi karbon dan sumber nitrogen, pH kultur, suhu pertumbuhan, dan konsentrasi oksigen terlarut (Sharma *et al.*, 2001).

### a. Faktor dari sumber karbon

Minyak tumbuhan yang berbeda digunakan untuk membandingkan produksi lipase dari *Ophiostoma piceae*. Aktivitas lipase dalam tingkat yang tinggi diperoleh ketika minyak nabati (zaitun, kedelai, bunga matahari, wijen, biji kapas, jagung dan minyak goreng dari kacang tanah) digunakan sebagai sumber karbon. Produksi lipase maksimum terjadi ketika minyak zaitun digunakan sebagai sumber karbon (Sharma *et al.*, 2001). Konsentrasi minyak zaitun antara 0,5 dan 1% memberikan aktivitas lipase maksimum sebesar 13 U/mL untuk *Penicillium restrictum*. Pada *Penicillium restrictum* aktivitas lipase sebesar 10 dan 5 U/mL didapatkan masing-masing dengan konsentrasi minyak zaitun sebesar 0,5 dan 1% (Lima *et al.*, 1991).

### b. Faktor dari Sumber Nitrogen

Sumber nitrogen seperti minuman keras dapat merangsang produksi enzim lipase tetapi untuk tingkat yang lebih rendah dari pepton. Urea dan ammonium sulfat menghambat sintesis lipase. *Acremonium strictum* menghasilkan sejumlah besar enzim lipase dalam kondisi stasioner dalam medium yang mengandung 35% (wt/vol) tepung kedelai sebagai sumber nitrogen. Produksi lipase ekstraselular yang maksimal dicapai oleh kapang termofilik, *Rhizopus oryzae*, ketika media yang berisi pepton digunakan sebagai sumber nitrogen. Penelitian produksi enzim lipase termostabil dari jamur termofilik *Emericella rugulose*, *Humicola* sp., *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium purpurogenum* dan *Chrysosporium sulfureum*, menggunakan ekstrak ragi sebagai sumber nitrogen yang memberikan produksi enzim lipase tinggi (Sharma *et al.*, 2001).

Sumber nutrisi juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim lipase yang dihasilkan dari *Aspergillus niger*. Sumber karbon seperti fruktosa dan sukrosa akan menginduksi aktivitas enzim,

sedangkan pati, laktosa dan CMC menghambat aktivitas enzim. Sumber nitrogen seperti kasein dan pepton akan meningkatkan produksi enzim. Sumber belerang seperti kalsium sulfat dan besi (II) sulfat serta antibiotik (ampicillin, tetrasiklin dan norfloxasin) akan menurunkan produksi enzim. Sedangkan sumber vitamin (riboflavin, asam folat dan vitamin C) akan menstimulasi produksi enzim lipase pada *Aspergillus niger* (Kakde dan Chavan, 2011).

Lipase basa dari *Apergillus niger* dihasilkan secara maksimal dalam medium yang mengandung ekstrak ragi (1%), polypeptone (2%) dan bungkil kedelai (3%) sebagai sumber nitrogen. Produksi lipase meningkat ketika medium dilengkapi dengan sumber anorganik nitrogen (ammonium nitrat). Penggunaan asam amino dan trypton meningkatkan hasil lipase bila dibandingkan dengan penggunaan ammonium, ekstrak ragi dan pepton protease. Namun, hasil dan stabilitas lipase dapat ditingkatkan dengan melengkapi pilihan sumber nitrogen organik dengan ammonium (Sharma *et al.*, 2001).

## **2.6 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Lipase**

Aktivitas enzim dinyatakan sebagai laju reaksi kimia berkatalis enzim dalam mengubah substrat menjadi produk. Aktivitas bergantung pada konsentrasi enzim dan keadaan reaksi seperti pH dan suhu. Percobaan untuk mengukur aktivitas enzim disebut uji enzim. Aktivitas enzim sering diukur dengan mengikuti munculnya produk berwarna atau menghilangnya substrat berwarna dalam beberapa waktu, atau reaksi yang melibatkan pengambilan atau pelepasan proton dapat diikuti dengan mengukur perubahan pH larutan uji menurut waktu. Tingkat aktivitas hampir selalu dilaporkan dalam unit internasional (UI). Nilai UI enzim menyatakan tingkat aktivitas enzim baku yang akan mengubah sejumlah substrat menjadi produk dalam waktu tertentu. Kesepakatan internasional mengenai nilai 1 UI ialah banyaknya enzim yang mengkatalisis



perubahan 1 mikromol ( $\mu$  mol) substrat per menit pada keadaan reaksi tertentu (Wilbraham dan Matta, 1992).

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim lipase, diantaranya adalah suhu, air, pelarut konsentrasi enzim dan substrat. Kecepatan reaksi kimia bertambah cepat dengan meningkatnya suhu. Hal ini disebabkan oleh peningkatan suhu menyebabkan peningkatan jumlah energi bagi molekul reaktan sehingga tumbukan antara molekul persatuan waktu lebih produktif. Inaktivasi enzim pada suhu tinggi disebabkan oleh dua hal yaitu adanya pembukaan partial struktural molekul enzim dan perubahan struktur primer enzim karena adanya perubahan atau kerusakan molekul-molekul asam amino tertentu (Efendi, 2001).

Suhu optimal lipase pada umumnya berkisar antara 30°-40°C. Aktivitas maksimum enzim lipase dari *Fusarium heterosporum* pada suhu 40° C berada pada kisaran pH 5.5 – 6.0 dan enzim stabil pada kisaran pH 4 – 10 pada 30°C selama 4 jam. Aktivitas enzim lipase juga dipengaruhi oleh kadar air. Air memegang peranan yang penting dalam proses inaktivasi enzim. Karena itu jika jumlah air dikurangi maka inaktivasi enzim oleh panas dapat diperlambat dan stabilitas termal enzim dapat meningkat. Aktivitas maksimum *Rhizopus arthicus* lipase (RAL) pada pH 7.6 berada pada kisaran  $a_w$  0,33 dan 0,75 (Efendi, 2001).

Pelarut organik merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim. Penggunaan enzim untuk sintesis dalam pelarut organik memberikan beberapa keuntungan antara lain, kelarutan substrat organik dan enzim dalam pelarut organik lebih tinggi dibandingkan dengan air, kestabilan enzim dalam pelarut organik meningkat dan isolasi produk murah. Namun ada juga kelemahan dari pelarut organik seperti residu pada produk akhir, toksisitas bagi makhluk hidup, mahal dan mudah terbakar (Efendi, 2001).

## 2.7 Analisa Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas enzim lipase dapat ditentukan dengan mengukur asam lemak yang dihasilkan. Asam lemak yang dihasilkan oleh

lipase dapat ditentukan secara titrimetri, kolorimetri sabun tembaga, spektrofotometri kromofor, metode isotop, gas kromatografi cair, metode enzimatik dan metode imunologi. Metode yang paling praktis adalah titrimetri dan kolorimetri sabun tembaga untuk studi enzimatik pemecahan lemak. Kolorimetri sabun tembaga mengukur warna setelah asam lemak dikonversi ke sabun tembaga dengan warna reagen. Metode kolorimetri awalnya dikembangkan oleh Duncombe (1963) menggunakan  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  dan tricanolamin sebagai reagen tembaga dan reagen warna, kemudian diubah dan diperbaiki untuk tujuan penelitian tertentu. Lowry dan Tinsley (1976) mengembangkan kolorimetri untuk penentuan asam lemak bebas dengan sensitivitas dan reproduktifitasnya dengan menggunakan tembaga asetat-piridin. Modifikasi metode dilakukan dengan mengganti benzena dengan heksana untuk penentuan asam lemak bebas yang terbentuk dalam hidrolisis enzimatik minyak zaitun dalam sistem pelarut. Sedangkan Kwon dan Rhee menyederhanakan metode Lowry dan Tinsley untuk menentukan asam lemak bebas dengan menghilangkan langkah penguapan pelarut dan langkah-langkah sentrifugasi untuk penentuan lipase (Kwon dan Rhee, 1986).

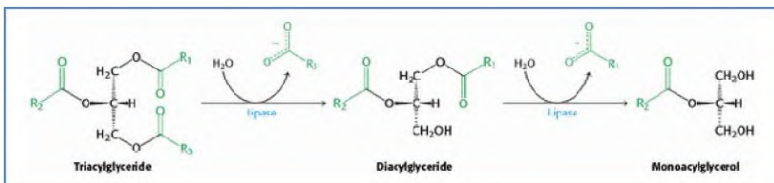
Menentukan aktivitas lipase pada sebuah sistem emulsi menurut metode kolorimetri konvensional, harus memperhatikan selektifitas dalam mengekstrak asam lemak bebas dari campuran reaksi dengan pelarut, menguapkan pelarut dan menggantinya dengan benzena atau pelarut lainnya dan kemudian menambahkan reagen warna diikuti dengan mencampur reagen campuran warna. Proses dilanjutkan dengan melakukan sentrifugasi untuk memisahkan fase pelarut dari fase cair. Aktivitas lipase ditentukan dengan mengamati perkembangan warna asam lemak bebas dalam fase pelarut. Untuk sistem dua fase, aktivitas enzim lipase ditentukan dengan mengambil supernatan mengandung asam lemak bebas dari campuran reaksi dan penguapan pelarut lain, diikuti dengan sentrifugasi warna reagen campuran. Kemudian aktivitas lipase ditentukan oleh pengujian asam lemak.

Semua metode kolorimetri diperlukan tahapan ekstraksi, penguapan dan sentrifugasi (Kwon dan Rhee, 1986).

Asam lemak bebas yang terbentuk selama hidrolisis substrat minyak zaitun oleh lipase dapat ditentukan dengan metode kolorimetri menggunakan tembaga asetat atau reagen piridin. Kompleks asam lemak dengan tembaga membentuk garam tembaga atau sabun yang menyerap cahaya pada kisaran tampak ( $\lambda$  maksimal 715) menghasilkan warna biru. Kuantifikasi asam lemak yang dihasilkan lipase ditentukan dengan mengacu pada kurva standar yang disiapkan dengan menggunakan asam oleat (Wrolstad *et al.*, 2003).

## 2.8 Mekanisme Degradasi Lipid

Degradasi ikatan lipid oleh lipase dilakukan melalui reaksi lipolisis. Lipolisis merupakan hidrolisis pada materi lipid hingga menghasilkan asam lemak bebas dan gliserida parsial (Shelley *et al.*, 1987 dalam Long, 2009). Lipase diketahui dapat dibedakan atas dua kelompok berdasarkan lokasi pemutusan ikatan gliserol pada triasilgliserol yaitu lipase non-spesifik dan lipase spesifik. Lipase non-spesifik memutus ikatan gliserol dari triasilgliserol pada tiga posisi, sehingga menghasilkan diasilgliserol, monoasilgliserol atau tiga molekul asam lemak dan gliserol. Lipase spesifik memutus ikatan gliserol dari triasilgliserol pada posisi satu dan tiga sehingga menghasilkan 1,2-diasilgliserol dan monoasilgliserol (Gandjar *dkk.*, 2006).



Gambar 2.8 Reaksi Hidrolisis Triglicerida (Berg *et al.*, 2006).

## 2.9 Limbah Organik dan Limbah Domestik

Berdasarkan Peraturan Pemerintah No. 18/1999 Jo.PP 85/1995 limbah didefinisikan sebagai sisa atau buangan dari suatu usaha dan/atau kegiatan manusia. Limbah adalah bahan buangan tidak terpakai yang berdampak negatif terhadap masyarakat jika tidak dikelola dengan baik. Limbah dapat dikelompokkan menjadi limbah organik dan limbah anorganik. Limbah organik adalah limbah yang mengalami pelapukan dan bisa diproses

Limbah dalam arti sederhana dapat artikan sebagai sampah. Dalam bahasa ilmiahnya limbah disebut juga dengan polutan. Maka limbah adalah buangan yang kehadirannya pada suatu saat dan tempat tertentu tidak dikehendaki lingkungannya. Limbah mengandung bahan pencemar yang bersifat racun dan berbahaya terutama yang bersumber dari industri (Sugiharto, 1987).

Limbah organik merupakan limbah yang mengandung senyawa organik. Senyawa organik yang terdapat dalam limbah seperti protein, karbohidrat dan lemak dimanfaatkan oleh mikroorganisme sebagai sumber nutrisi untuk menghasilkan energy (Gower,1980).

Menurut Asis (1992) *dalam* Nurmayanti (2002), limbah domestik adalah semua bahan limbah yang berasal dari kamar mandi, kakus, dapur, tempat cuci pakaian dan cuci peralatan rumah tangga. Limbah domestik memiliki sebaran areal yang sangat luas dan umumnya terdiri atas limbah rumah tangga, perkantoran dan restoran. Keputusan Meneg LH No 112 Tahun 2003, pasal 1 ayat 1 menyebutkan bahwa air limbah domestik adalah air limbah yang berasal dari usaha dan atau kegiatan permukiman, rumah makan, perkantoran, perniagaan, apartemen dan asrama (Nurmayanti, 2002).

Limbah cair adalah limbah yang mempunyai sifat cair dimana komposisinya terdiri atas 99,9% air dan sisanya bahan padat (Mahida, 1995). Selanjutnya dinyatakan bahwa limbah domestik cair terdiri atas buangan kamar mandi, dapur, tempat cucian, unsur unsur yang terdapat di dalamnya merupakan unsur yang sangat kompleks. Menurut Martopo (1984) *dalam*

Nurmayanti (2002) campuran rumit yang terdapat dalam kotoran ini terdiri dari zat-zat batuan mineral dan organik dalam bentuk partikel-partikel besar dan kecil, benda padat sisa bahan-bahan larutan dalam keadaan terapung, bentuk koloid dan setengah koloid.

Secara lengkap disebutkan oleh Dix (1981) bahwa limbah cair terdiri atas 99,9% bentuk cair yang meliputi bahan organik, anorganik, padatan tersuspensi, koloida, padatan terlarut dan mikroorganisme. Bahan organik meliputi kertas, tinja, urin, sabun, lemak, deterjen dan sisa makanan. Sedang bahan anorganik, seperti amonia dan garam garam amonium yang antara lain merupakan derivat dari dekomposisi tinja, urin dan nitrat.

Sisa dari bentuk cair tersebut adalah berupa bahan padat (0,1%) yang terdiri atas bahan organik dan bahan anorganik. Bahan organik tersusun dari protein (65%), karbohidrat (25%) dan lemak (10%). Kadang-kadang dapat berupa pestisida, phenol, deterjen dan bahan lainnya. Bahan anorganik tersusun atas butiran dan garam metal (Mahida, 1995 *dalam* Nurmayanti, 2002).

Volume limbah domestik sangat bervariasi dan umumnya sangat berkaitan erat dengan standar hidup masyarakat (Djajaningrat dan Harsono, 1991). Di negara-negara berkembang termasuk Indonesia, pencemaran domestik merupakan jumlah pencemar terbesar (85%) yang masuk ke badan air. Sedang dinegara-negara maju, pencemar domestik merupakan 15% dari seluruh pencemar yang memasuki badan air (Suriawiria, 1996).

### **2.9.1 Limbah cair perikanan**

Limbah cair industri perikanan mengandung bahan organik yang tinggi. Tingkat pencemaran limbah cair industri pengolahan perikanan sangat tergantung pada tipe proses pengolahan dan spesies ikan yang diolah (River *et al.*, 1998).

Jumlah debit air limbah pada efluen umumnya berasal dari proses pengolahan dan pencucian. Setiap operasi pengolahan ikan akan menghasilkan cairan dari pemotongan, pencucian, dan pengolahan produk. Cairan ini mengandung darah dan potongan-

potongan kecil ikan dan kulit, isi perut, kondensat dari operasi pemasakan, dan air pendinginan dari kondensor (River *et al.*, 1998).

Selanjutnya River *et al.*, (1998) menyatakan bahwa bagian terbesar kontribusi beban organik pada limbah perikanan berasal dari industri pengalengan dengan beban COD 37,56 kg/m<sup>3</sup>, disusul oleh industri pengolahan fillet ikan salmon yang menghasilkan beban limbah 1,46 kg COD/m<sup>3</sup>. Kemudian industri krustasea dengan beban COD yang kecil. Perbandingan beban organik yang disumbangkan oleh industri pengalengan, pemfiletan salmon dan krustasea adalah 74,3%, 21,6% dan 4,1%. Peneliti yang lain juga melaporkan hal yang sama dengan indikator beban pencemar organik yang lain yang berasal dari industri pengolahan perikanan. Persentase kandungan bahan organik terhadap beberapa limbah cair perikanan industri terdapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Kandungan Bahan Organik pada Industri Perikanan (River *et al.*, 1998)

Jenis industry	BOD	COD	Lemak/ Minyak	Padatan tersuspensi
Pengolahan ikan (manual)	3.32 kg/t	-	0.348 kg/t	1.42 kg/t
Pengolahan ikan (mekanis)	11.9 kg/t	-	2.48 kg/t	8.92 kg/t
Pemiletan herring	3428-10000 mg/l	-	857-6000 mg/l	-
Pengalengan tuna	6.8-20 kg/t	14-64 kg/t	1.7-13 kg/t	3.8-17 kg/t
Pengolahan sardine	9.22 kg/t	-	1.74 kg/t	5.41 kg/t
Pengolahan rajungan	4.8-5.5 kg/t	7.2-7.8 kg/t	0.21-0.3 kg/t	0.7-0.78 kg/t
Pengolahan kerang (mekanis)	5.14 kg/t	-	0.145 kg/t	10.2 kg/t
Pengolahan kerang (konvensional)	18.7 kg/t	-	0.461 kg/t	6.35 kg/t

### **2.9.2 Minyak goreng bekas**

Salah satu kebutuhan penting yang diperlukan oleh masyarakat Indonesia adalah minyak goreng. Minyak goreng adalah minyak nabati yang telah dimurnikan dan dapat digunakan sebagai bahan pangan. Minyak selain memberikan nilai kalori paling besar diantara zat gizi lainnya juga dapat memberikan rasa gurih, tekstur dan penampakan bahan pangan menjadi lebih menarik, serta permukaan yang kering (Dewi dan Hidajati, 2012).

Minyak goreng juga membuat makanan menjadi renyah, kering, dan berwarna keemasan/kecoklatan, akan tetapi jika minyak goreng digunakan secara berulang kali akan membahayakan kesehatan (Widayat *dkk.*, 2006). Minyak goreng berfungsi sebagai penghantar panas, serta penambah rasa gurih dan penambah nilai kalori pada bahan pangan yang digoreng. Minyak goreng dapat diproduksi dari berbagai macam bahan mentah, misalnya kelapa, kopra, kelapa sawit, kacang kedelai, biji jagung (lembaganya), biji bunga matahari, biji zaitun (olive), dan lain-lain (Widayat *dkk.*, 2006).

Umumnya, minyak goreng (nabati) mengandung asam lemak jenuh yang bervariasi. Asam lemak jenuh berpotensi meningkatkan kolestrol darah, sedangkan asam lemak tak jenuh dapat menurunkan kolestrol darah. Dalam penurunan kolestrol darah tersebut dapat dikatakan bahwa asam lemak tak jenuh tunggal lebih efektif. Kerusakan minyak atau lemak akibat pemanasan pada suhu tinggi (200-250°C) akan mengakibatkan keracunan dalam tubuh dan berbagai macam penyakit, misalnya diareha, pengendapan lemak dalam pembuluh darah, kanker dan menurunkan nilai cerna lemak (Khomsan, 2010).

### **2.9.3 Tangki septik**

Tangki septik merupakan suatu ruangan kedap air atau beberapa kompartemen ruangan yang berfungsi menampung dan mengolah air limbah rumah tangga dengan kecepatan alir yang lambat, sehingga member kesempatan untuk terjadi pengendapan terhadap suspensi benda-benda padat dan kesempatan untuk

penguraian bahan-bahan organik oleh jasad anaerobik membentuk bahan-bahan larut air dan gas. Ketika air limbah melewati tangki septik, padatan yang lebih berat akan terbenam di bawah dan mengalami degradasi oleh bakteri. Reduksi ini akan mengubah kuantitas dari padatan dan komposisi menjadi lumpur, yang berada di bawah tangki. Materi seperti lemak dan minyak mengapung pada permukaan dalam tangki (Departemen of Health Australia,2011).



Gambar 2.10 Sistem Tangki Septik (Purwanti, 2003).

Tinja (*faeces*) adalah bahan buangan yang dikeluarkan dari tubuh manusia melalui anus sebagai sisa dari proses pencernaan makanan di sepanjang system saluran pencernaan (*tractus digestifus*). Pengertian tinja mencakup juga air seni (*urine*) yang dikeluarkan dari tubuh manusia melalui system urogenitalis (Soeparman dan Suparmin,2001), perkiraan kuantitas tinja manusia tanpa air seni adalah 135-270 gram per kapita per hari berat basah atau 35-70 gram per kapita per hari berat kering. Sedangkan, perkiraan volume air seni sebesar 1,0-1,3 liter per kapita per hari dengan jumlah bahan padat kering sebesar 50-70 gram per kapita per hari. Menurut Azwar (1995), kedua jenis kotoran manusia ini sebagian besar berupa air terdiri dari zat-zat organik seperti nitrogen, fosfor, kalium, lemak dan sebagainya (Tabel 2.2).



Tabel 2.2 Komposisi Limbah Cair Tangki Septik (Khatuddin, 2003).

Uraian	Tinja	Urin
BOD	16.44 mg/hari	8.22 mg/hari
Fosfor	1.37 mg/hari	2.47 mg/hari
Nitrogen	3.84 mg/hari	27.40 mg/hari
Kalium	2.47 mg/hari	6.30 mg/hari
Jumlah air kotor	25-40 kg/hari	60-100 kg/hari

Asumsi: tiap rumah tangga terdiri dari 3 orang

Per gram per kapita tinja mengandung banyak mikroorganisme berupa bakteri, virus, protozoa, ataupun cacing-cacing parasit. *Coliform bacteria* yang dikenal sebagai *Eschericia coli* dan *Fecal streptococci (enterococci)* yang sering terdapat di saluran pencernaan manusia, dikeluarkan dari tubuh manusia dan hewan-hewan berdarah panas dalam jumlah besar rata-rata sekitar 50 juta per gram (Hammer, 1977 dalam Soeparman dan Suparmin, 2001).

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”.**

## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juni 2014, di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

### **3.2 Metode yang Digunakan**

#### **3.2.1 Peremajaan isolat kapang**

Isolat kapang yang didapatkan dari koleksi kultur murni laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS dibuat menjadi 2 sub kultur yaitu kultur stok dan kultur kerja. Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3 Subkultur dilakukan ke dalam media agar miring PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang telah disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C tekanan 1.5 atm selama 15 menit. Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari, kultur stok disimpan di lemari es dan disubkultur setiap bulan.

#### **3.2.2 Preparasi inokulum dan enumerasi spora isolat**

Kultur isolat yang berusia 120 jam dalam medium PDA (*Potato Dextrose Agar*), ditambahkan 10 mL aquades steril ke dalamnya. Dilakukan pelepasan spora menggunakan jarum inokulasi. Kemudian tabung divortex untuk memisahkan gumpalan spora dan untuk mendapatkan suspensi yang homogen. Jumlah spora dihitung dengan menggunakan *Haemocytometer Neubauer* untuk mendapatkan 10<sup>6</sup> spora/mL yang akan digunakan sebagai inokulum (Kavanagh, 2005).

#### **3.2.3 Pembuatan kurva pertumbuhan**

Kurva pertumbuhan menggunakan media PDB (*Potato Dextrose Broth*). Media dibuat dengan cara 250 gram kentang dikupas, dicuci, dan dipotong dadu 1x1 cm. Kentang direbus dengan 1 liter aquades steril selama 2 jam. Volume aquades

dijaga selama proses perebusan. Setelah 2 jam, hasil ekstrak kentang ditempatkan ke dalam Erlenmeyer 1000 mL. Kemudian ditambahkan 20 gram dextrose. Medium cair kemudian dihomogenkan sampai larut dan dipanaskan hingga mendidih. Medium dipindahkan masing-masing 125 mL pada 7 Erlenmeyer 250 mL kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C tekanan 1.5 atm selama 15 menit.

Isolat murni kapang *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3 diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam masing-masing medium PDB (*Potato Dextrose Broth*). Pertumbuhan dikontrol tiap 24 jam selama 7 hari, dengan mengukur nilai biomasanya. Nilai biomassa diperoleh dengan cara menimbang berat kering isolat yang tumbuh pada medium PDB (*Potato Dextrose Broth*). Data biomassa yang diperoleh kemudian disajikan dalam grafik pertumbuhan.

### **3.2.4 Pembuatan starter inokulum**

Sebanyak 10% suspensi spora ( $10^6$  spora/mL) diinokulasikan dalam Erlenmeyer 250 mL yang berisi medium basal lipase sebanyak 150 mL. Medium basal terdiri dari 3,0 % pepton; 0,2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05% KCL dan 1% minyak zaitun: glukosa (0,5:0,5), pH 6,6 yang dilarutkan dalam 125 mL aquades dan disterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C tekanan 1.5 atm selama 15 menit (Akhtar et al., 1980). Kemudian diinkubasi menggunakan *shaker incubator* dengan masa inkubasi sesuai dengan hasil kurva pertumbuhan pada suhu ruang, dengan kecepatan 120 rpm.

### **3.2.5 Proses pengambilan limbah cair organik dan karakterisasi**

Sampel limbah cair masing-masing diambil secara langsung dari setiap lokasi pembuangan limbah menggunakan botol sampel steril volume 1000 mL dengan tiga kali pengulangan. Sampel diambil pada bagian outlet (pengeluaran limbah cair) yang tidak terdapat sirkulasi air. Sampel air tersebut ditutup rapat, diberikan label dan dimasukkan ke dalam *ice box*.

Karakterisasi sampel limbah cair dilakukan dengan menganalisis kandungan lipid dan parameter lainnya yaitu kualitas air limbah meliputi pH dan suhu.

### **3.2.6 Degradasi lipid dari limbah organik oleh isolat kapang terpilih**

Medium produksi yang digunakan berasal dari limbah organik. Limbah organik yang digunakan adalah limbah pencucian ikan, limbah air tanki septik dan limbah minyak goreng bekas.

Limbah pencucian ikan dan limbah air tanki septik ditreatment dengan melakukan filtrasi untuk memisahkan dengan bahan yang tidak terlarut dengan medium limbah organik. Sedangkan untuk limbah minyak goreng bekas ditambahkan sebanyak 20% medium starter dan 10% Tween 80 kemudian dihomogenkan hingga terbentuk emulsi. Masing-masing limbah organik diukur derajat keasaman (pH). Kemudian medium limbah organik ini ditempatkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL sebanyak 125 mL dan dilakukan tiga kali replikasi atau pengulangan. Kemudian medium di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm. Selanjutnya diatur pH medium menjadi pH 7 (netral) sesuai dengan hasil uji pendahuluan.

Starter berdasarkan hasil kurva pertumbuhan *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3 diinokulasikan sebanyak 10% secara aseptik ke dalam medium limbah organik dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 40°C sesuai dengan hasil uji pendahuluan (Maia *et al.*, 2001). Kontrol negatif merupakan medium limbah organik yang tidak diberi perlakuan penambahan isolat kapang *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3. Pengukuran kadar lipid dilakukan pada kandungan awal asam lemak pada medium limbah organik dan kandungan akhir setelah diberikan perlakuan inokulasi isolat kapang *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3 secara tunggal maupun konsorsium.

### 3.2.7 Pembuatan kurva standar asam oleat

Triolein merupakan trigliserida utama pada seluruh varietas minyak zaitun dengan konstentrasi antara 44,8% hingga 54,7% (Aranda *et al.*, 2004). Triolein merupakan trigliserida dengan ketiga komponen asam lemaknya berupa asam oleat. Kurva standar asam oleat dibuat dengan beberapa variasi konsentrasi asam oleat. Konsentrasi yang digunakan adalah 3,5;7;10,5;14 dan 17,5 (  $\times 10^{-3}$  M). variasi konsentrasi larutan tersebut dibuat dengan menggunakan larutan standar asam oleat 0,07M larutan tersebut diambil sebanyak 0,5;1;1,5;2;2,5 mL lalu diencerkan dengan etanol 96% hingga 10 mL. Selanjutnya campuran diambil 2 mL dan ditambahkan reagen tembaga (II) asetat sebanyak 0,5 mL lalu divortex selama 1 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer (Genesys 20,4001/4<sup>®</sup>, USA) dengan panjang gelombang 715 nm (Lowry *et al.*, 1976).

### 3.2.8 Analisis lipid pada limbah organik

Analisis kandungan lipid pada limbah cair dilakukan dengan mengukur kadar asam lemak bebas berupa asam oleat menggunakan metode kolorimetri (Kwon and Rhee,1986)

Pengukuran sampel dilakukan dengan cara menambahkan 2mL sampel limbah cair dengan 5mL etanol 96%. Campuran selanjutnya dikocok kuat dan lapisan atas diambil sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat. Absorbansi campuran diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 715 nm. Hasil absorbansi dihitung konsentrasinya dengan persamaan matematik dari kurva standar asam oleat, sehingga akan didapatkan kadar asam lemak (asam oleat) yang terkandung dalam sampel limbah cair

Nilai degradasi dapat ditentukan dengan rumus:

$$\text{Nilai Degradasi} = \frac{(\text{Konsentrasi akhir} - \text{Konsentrasi awal})}{\text{Konsentrasi awal}} \times 100\%$$

### 3.2.9 Uji penentuan aktivitas lipase

Penentuan aktivitas lipase ditentukan dengan menggunakan metode Kwon dan Rhee (Kwon and Rhee, 1986). Enzim lipase yang telah diproduksi pada medium limbah dipisahkan filtrat dan supernatannya dengan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Filtrat diasumsikan sebagai enzim kasar. Penentuan aktivitas lipase dilakukan pada jam ke – 120. Substrat yang digunakan dalam metode ini adalah minyak zaitun (Le Riche®, PT Ishma mediterranea: Al-Jazair) sebanyak 1,5 mL kemudian ditambahkan dengan 1 mL buffer fosfat pH 7 dan 1 mL larutan enzim kasar. Campuran ini selanjutnya diinkubasi pada *shaker incubator* pada suhu ruang dengan kecepatan pengocokan 120 rpm selama 30 menit. Selanjutnya campuran ditambahkan larutan 1 mL HCL 6N dan 5 mL reagen etanol 96%. Campuran selanjutnya dikocok kuat dan lapisan atas diambil sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat dan divortex selama 1 menit. Absorbansi campuran diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 715 nm.

Nilai konsentrasi asam oleat yang terbentuk sebagai hasil degradasi lipase dapat diketahui dari data absorbansi yang terukur. Nilai konsentrasi asam oleat tersebut kemudian digunakan untuk menentukan nilai aktivitas lipase.

Nilai aktivitas lipase ditentukan dengan rumus:

$$Ae = \frac{\text{konsentrasi Asam oleat } \left(\frac{\text{mmol}}{\text{mL}}\right)}{\text{Waktu Inkubasi (menit)}} \times \frac{\text{volume total campuran (mL)}}{\text{volume enzim (mL)}}$$

Keterangan:

Ae : aktivitas enzim (U/mL)

### 3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian ini bersifat deskriptif kuantitatif. Untuk mengetahui pengaruh medium limbah organik terhadap besarnya nilai aktivitas lipase isolat *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3 secara tunggal maupun konsorsium maka digunakan rancangan penelitian berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor yaitu jenis

medium limbah organik dan jenis isolat. Penelitian ini menggunakan tiga kali ulangan.

Data pengaruh medium limbah organik terhadap aktivitas lipase dianalisis dengan menggunakan ANOVA *Oneway* dengan hipotesa :

$H_0$  : Tidak ada pengaruh jenis medium limbah organik dan isolat *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3 secara tunggal maupun konsorsium terhadap aktivitas lipase.

$H_1$ : Ada pengaruh jenis medium limbah organik dan isolat *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3 secara tunggal maupun konsorsium terhadap aktivitas lipase.

Jika  $H_1$  diterima maka dilanjutkan dengan uji Duncan dengan tingkat kesalahan 5%.

Berikut merupakan tabel rancangan penelitian :

**Tabel 3.1** Limbah Pencucian Ikan

Isolat	1	2
A	A.1	A.2
B	B.1	B.2
C	C.1	C.2
D	D.1	D.2
E	E.1	E.2
F	F.1	F.2
G	G.1	G.2
H	H.1	H.2

Keterangan :

1 : Nilai Aktivitas Enzim

2 : Nilai Degradasi Lipid

A : *Mortierella* sp. T3.G1

B : *Aspergillus niger* T2.1

C : *Penicillium* sp.1 T4.E3

D : Konsorsium *Mortierella* sp. T3.G1 dan *Aspergillus niger* T2.1

E : Konsorsium *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3

F : Konsorsium *Mortierella* sp. T3.G1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3



G : Konsorsium *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3

H : Kontrol (tanpa pemberian isolat)

**Tabel 3.2** Limbah Minyak Goreng Bekas

Isolat	1	2
A	A.1	A.2
B	B.1	B.2
C	C.1	C.2
D	D.1	D.2
E	E.1	E.2
F	F.1	F.2
G	G.1	G.2
H	H.1	H.2

Keterangan :

1 : Nilai Aktivitas Enzim

2 : Nilai Degradasi Lipid

A : *Mortierella* sp. T3.G1

B : *Aspergillus niger* T2.1

C : *Penicillium* sp.1 T4.E3

D : Konsorsium *Mortierella* sp. T3.G1 dan *Aspergillus niger* T2.1

E : Konsorsium *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3

F : Konsorsium *Mortierella* sp. T3.G1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3

G : Konsorsium *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3

H : Kontrol (tanpa pemberian isolat)

**Tabel 3.3** Limbah Tangki Septik

Isolat	1	2
A	A.1	A.2
B	B.1	B.2
C	C.1	C.2
D	D.1	D.2
E	E.1	E.2
F	F.1	F.2
G	G.1	G.2
H	H.1	H.2

Keterangan :

1 : Nilai Aktivitas Enzim

2 : Nilai Degradasi Lipid

A : *Mortierella* sp. T3.G1

B : *Aspergillus niger* T2.1

C : *Penicillium* sp.1 T4.E3

D : Konsorsium *Mortierella* sp. T3.G1 dan *Aspergillus niger* T2.1

E : Konsorsium *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3

F : Konsorsium *Mortierella* sp. T3.G1 dan *Penicillium* sp.1 T4.E3

G : Konsorsium *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1 dan  
*Penicillium* sp.1 T4.E3

H : Kontrol (tanpa pemberian isolat)

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim lipase yang dihasilkan dari isolat kapang *Mortierella* sp. T3.G1, *Aspergillus niger* T2.1, *Penicillium* sp.1 T4.E3 secara tunggal dan konsorsium dalam mendegradasi lipid pada medium limbah organik yang berbeda. Isolat diperoleh dari koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS yang merupakan hasil isolasi dari tanah daerah mangrove Wonorejo. Medium limbah organik yang digunakan adalah limbah pencucian ikan, limbah tangki septik dan limbah minyak goreng bekas. Pemilihan tiga limbah organik yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada limbah pencemar yang umumnya ditemukan pada perairan tercemar.

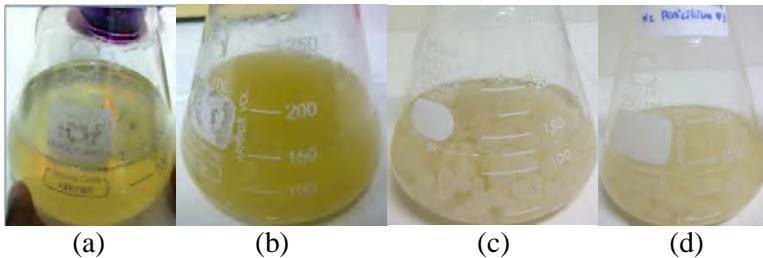
#### **4.1 Kurva Pertumbuhan Isolat**

Setiap organisme mempunyai pola yang khas dalam pertumbuhannya. Pola pertumbuhan digambarkan dalam bentuk kurva yang diperoleh dari menghitung massa sel dari kapang atau kekeruhan media pada khamir dalam waktu tertentu. Fase pertumbuhan kapang terbagi menjadi 4, yaitu fase lag, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian (Gandjar, 2006). Fase pertumbuhan kapang dapat diketahui dengan perbanyakan biomassa kapang melalui fermentasi. Medium yang digunakan dalam pertumbuhan kapang adalah medium PDB (*Potato Dextrose Broth*) yang mengandung ekstrak kentang, dextrose dan klorampenikol. Ekstrak kentang berfungsi sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan sel dan dextrose berfungsi sebagai sumber karbon. Sedangkan klorampenikol berfungsi sebagai antibakteri yang dapat menekan pertumbuhan bakteri yang menyebabkan kontaminasi.

Perbanyakan biomassa pada isolat kapang menggunakan fermentasi dengan pengocokan menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Pengocokan bertujuan untuk

meningkatkan aerasi untuk penyediaan oksigen untuk pertumbuhan. Menurut Gandjar (2006) menyatakan bahwa pertumbuhan kapang pada medium cair yang digoyang akan tampak bentuk seperti granul atau kapas kecil melayang-layang dalam medium dan tidak tampak adanya sporulasi. Bentuk-bentuk seperti granul tersebut adalah spora yang telah tumbuh menjadi miselium.

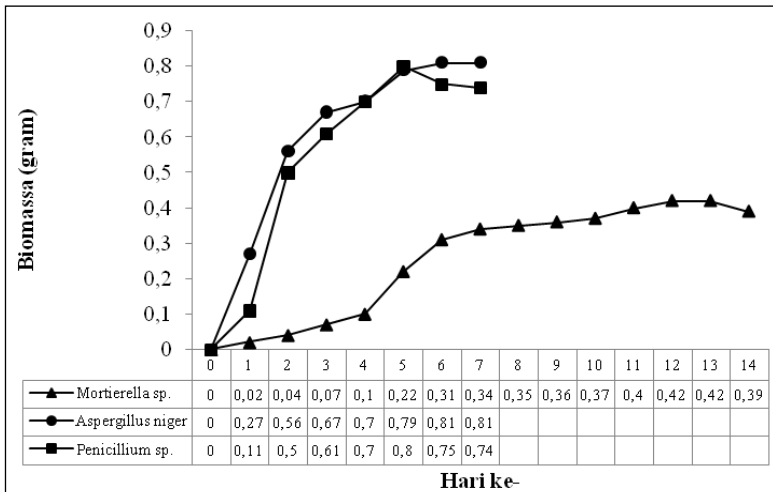
Pertumbuhan kapang pada medium PDB (*Potato Dextrose Broth*) *Mortierella* sp. T3.G1 ditandai dengan adanya bentuk seperti kapas kecil halus berwarna putih dan terjadi perubahan warna dari berwarna kuning jernih menjadi kuning keruh kecoklatan. Untuk pertumbuhan *Aspergillus niger* T2.1 dan *Penicillium* sp. T4.E3 ditandai dengan terbentuknya granul-granul kecil (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Pertumbuhan Isolat Pada Medium PDB (a) Medium PDB tanpa penambahan isolat (b) setelah penambahan *Mortierella* sp. T3.G1 (c) setelah penambahan *Aspergillus niger* T2.1 (d) setelah penambahan *Penicillium* sp. T4.E3

Pemisahan miselium dari medium melalui suatu penyaringan atau filtrasi. Hasil penyaringan kemudian dioven hingga memiliki berat konstan. Biomassa diperoleh dari selisih berat hasil penyaringan dan berat kertas saring. Hasil perhitungan biomassa selama 7 hingga 14 hari kemudian dibuat grafik hingga diperoleh grafik kurva pertumbuhan (Gambar 4.2). Hasil grafik kurva pertumbuhan dari tiga isolat yang telah diperoleh digunakan sebagai acuan dalam penentuan usia starter pada uji degradasi

lipid. Penentuan usia starter yakni  $\frac{1}{2}$  dari fase log. Fase log merupakan fase sebelum fase stasioner dimana pada fase ini terdiri dari fase akselerasi, fase eksponensial dan fase deselerasi. Pada fase ini terjadi pembelahan sel terjadi secara cepat dan membutuhkan energi yang lebih banyak dibandingkan dengan fase lainnya (Hoog, 2005).



Gambar 4.2 Grafik Kurva Pertumbuhan (—▲—)*Mortierella* sp. T3.G1 (—■—)*Penicillium* sp. T4.E3. (—●—) *Aspergillus niger* T2.1

Dari kurva di atas dapat diketahui bahwa pertumbuhan *Penicillium* sp. T4.E3 dan *Aspergillus niger* T2.1 memiliki pola kurva pertumbuhan hampir sama, sedangkan untuk isolat *Mortierella* sp. T3.G1 membutuhkan waktu lebih lama untuk mencapai fase stasioner. Fase log pada isolat *Penicillium* sp. T4.E3 dan *Aspergillus niger* T2.1 terjadi dari hari ke- 0 hingga hari ke- 6, sehingga dapat ditentukan untuk usia starter dari kedua isolat adalah pada hari ke-3. Sedangkan fase log dari isolat *Mortierella* sp. T3.G1 terjadi dari hari ke- 0 hingga hari ke-12, sehingga penentuan usia starter dari isolat *Mortierella* sp. T3.G1 adalah pada hari ke-6. Hasil penentuan usia starter nantinya

digunakan sebagai acuan untuk masa inkubasi isolat di dalam medium starter pada uji degradasi limbah organik.

#### **4.2 Uji Aktivitas Lipase dan Degradasi Lipid pada Medium Limbah Cair Organik**

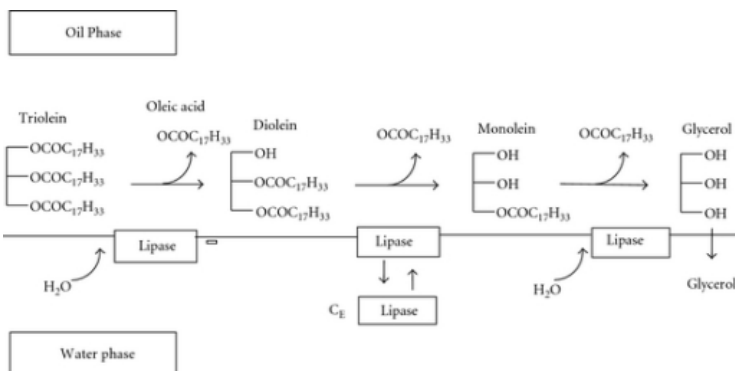
Uji aktivitas lipase merupakan suatu uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan enzim yang dihasilkan dari mikroorganisme (dalam hal ini kapang) dalam mengkatalisis substratnya dalam suatu waktu tertentu. Aktivitas lipase dihitung dalam satuan unit/mL. Satu unit tiap mL lipase (U/mL) didefinisikan sebagai banyaknya mL enzim lipase yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 $\mu$ mol asam oleat tiap menit dengan minyak zaitun sebagai substrat. Metode yang digunakan adalah metode kolorimetri (Kwon dan Rhee, 1986).

Uji degradasi lipid merupakan suatu uji yang dilakukan untuk mengetahui produksi lipase. Degradasi ikatan lipid oleh lipase dilakukan melalui reaksi lipolisis. Lipolisis merupakan hidrolisis pada materi lipid hingga menghasilkan asam lemak bebas dan gliserida parsial (Shelley *et al.*, 1987 dalam Long, 2009). Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi nilai degradasi maka semakin tinggi proses lipolisis yang terjadi sehingga semakin banyak enzim lipase yang ada di dalam substrat.

Mekanisme lipolisis dimulai dengan adsorpsi lipase ke dalam fase minyak-air. Kemudian lipase memecah ikatan ester dari triolein sehingga menghasilkan diolein, monoolein dan gliserol. Selama katalisis, asam oleat terbentuk pada setiap tahap reaksi. Gliserol terbentuk pada fase hidrofilik dengan demikian larut dalam fase air. Mekanisme lipolisis ini seperti yang dijelaskan pada studi hidrolisis triolein dari lipase *Candida rugosa* (Gambar4.3) (Hermansyah *et al.*, 2007).

Nilai aktivitas enzim dan degradasi nantinya dapat dikorelasikan sehingga dapat diketahui pengaruh medium limbah organik sebagai substrat terhadap aktivitas enzim lipase dari isolat terpilih. Isolat yang optimal untuk degradasi limbah merupakan

isolat yang memiliki aktivitas lipase tinggi dengan nilai degradasi yang tinggi pula.



Gambar 4.3. Mekanisme Hidrolisis Triolein oleh Lipase yang dihasilkan *Candida rugosa* pada sistem bifase minyak-air. (CE menunjukkan konsentrasi enzim pada fase air (Hermansyah *et al.*, 2007))

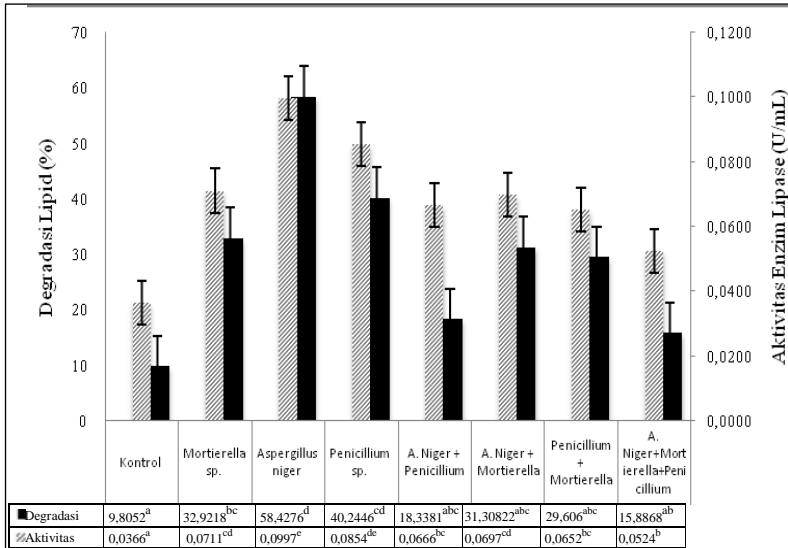
#### 4.2.1 Limbah Pencucian Ikan

Limbah pencucian ikan didapatkan dari Instalasi Pencucian Ikan dan Pengasapan Ikan di Kenjeran-Surabaya Timur, dengan konsentrasi COD 4.860 mg/L; total solid 4.176 mg/L; nitrat 103,5 mg/L; fosfat 67,23 mg/L serta minyak dan lemak 180 mg/L (Wardhani, 2006). Karakteristik dari limbah cair pencucian ikan di Instalasi Pencucian dan Pengasapan Ikan di Kenjeran memiliki nilai pH sebesar 7 dan suhu 32°C.

Lipid yang terkandung di dalam limbah pencucian ikan terbentuk dalam emulsi minyak di dalam air (*oil in water O/W*), dimana fase minyak sebagai fase terdispersi. Agen pengemulsi (non ionik surfaktan) pada *amphiphilic nature* seperti limbah pencucian ikan, disebut dengan HLB (*hydrophyle-lipophile balance*) dengan kisaran angka yang rendah (Shaw, 1991).

Karakteristik limbah pencucian ikan memiliki nilai pH 7 dan suhu 32°C dengan jumlah total asam lemak sebesar 0,130 µmol/mL.

Hasil aktivitas lipase dan degradasi lipid pada limbah pencucian ikan dengan menggunakan kapang dilakukan dengan metode fermentasi cair dengan masa inkubasi selama 7 hari. Hasil aktivitas lipase dan degradasi lipid ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Grafik Aktivitas Lipase dan Degradasi Lipid di dalam Medium Limbah Pencucian Ikan

Berdasarkan grafik di atas, dapat diketahui bahwa penambahan isolat tunggal dan konsorsium mempengaruhi nilai aktivitas lipase dan degradasi lipid yang dihasilkan pada medium limbah pencucian ikan. Hal ini ditunjang dengan analisa data menggunakan ANNOVA *oneway* yang menunjukkan P value sebesar 0,000. Analisa data dilanjutkan dengan uji Duncan sehingga diperoleh notasi yang menunjukkan tingkat signifikansi. Semakin besar notasi maka menunjukkan pengaruh yang besar.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas yang memiliki nilai signifikansi paling tinggi adalah isolat *Aspergillus niger* sebesar 0,0997<sup>e</sup> U/mL dengan degradasi lipid sebesar 58,43<sup>d</sup> %.



Dilanjutkan dengan isolat *Penicillium* sp. yang memiliki aktivitas lipase sebesar 0,0854<sup>de</sup> U/mL dengan degradasi lipid sebesar 40,24<sup>cd</sup> %. Perbedaan tingkat aktivitas lipase dan degradasi lipid ini didasarkan pada kecepatan pertumbuhan dari masing-masing isolat. Pada isolat *A. niger* memiliki tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan kedua isolat yang lainnya seperti pada kurva pertumbuhan.

Pada konsorsium *Mortierella* sp dan *Aspergillus niger* yang memiliki nilai aktivitas lipase sebesar 0,0697<sup>cd</sup> U/mL dengan nilai degradasi lipid sebesar 31,31<sup>abc</sup> %. Nilai ini berada dalam taraf signifikansi yang sama dengan *Mortierella* sp. yang memiliki aktivitas lipase sebesar 0,0711<sup>cd</sup> U/mL dengan degradasi lipid sebesar 32,92<sup>bc</sup> %. Hal ini menunjukkan aktivitas kedua perlakuan dalam mendegradasi limbah pencucian ikan tidak berbeda nyata.

Pada konsorsium isolat *A. niger* dan *Penicillium* sp., memiliki aktivitas lipase sebesar 0,0666<sup>bc</sup> U/mL dengan nilai degradasi lipid sebesar 18,34<sup>abc</sup>%. Konsorsium dari kedua isolat dapat dilihat pada hasil uji interaksi (Lampiran 9) yang menunjukkan bahwa kedua nya tumbuh secara sinergis. Nilai degradasi menunjukkan nilai yang lebih rendah dari nilai degradasi isolat dalam kondisi tunggal. Rendahnya nilai degradasi dikarenakan asam lemak hasil hidrolisis sebagian besar telah di metabolisme oleh isolat untuk kebutuhan nutrisi, sehingga sedikit konsentrasi asam lemak yang terdeteksi.

Sedangkan pada konsorsium *Mortierella* sp dan *Penicillium* sp. yang memiliki nilai lebih rendah yakni aktivitas lipase sebesar 0,0652<sup>bc</sup> U/mL dan nilai degradasi lipid sebesar 29,60<sup>abc</sup> %. Perbedaan nilai ini kembali pada kemampuan isolat dalam melakukan kompetisi. Beberapa kompetisi dapat menghambat pertumbuhan kompetitornya dengan memproduksi metabolit sekunder baik berupa antifungal maupun zat toksik lainnya. Salah satu spesies dari *Penicillium* yakni *Pencillium solitum* diketahui mampu memproduksi zat antifungal berupa kompaktin ( Frisvad and Filtenborg, 1989)

Konsorsium tiga isolat menunjukkan nilai yang paling rendah dengan nilai aktivitas lipase sebesar  $0,0524^b$  U/mL dan nilai degradasi lipid sebesar  $15,88^{ab}$  %. Hal ini disebabkan adanya kompetisi interspesies sehingga terjadi penghambatan pertumbuhan spesies lain. Spesies yang dapat mengeluarkan antifungal yakni *Penicillium* sp. menekan pertumbuhan dari *Mortierella* sp dan *A.niger*. Hal ini dapat dilihat pada hasil uji interaksi (Lampiran 9). Rendahnya nilai degradasi menunjukkan produksi lipase yang rendah, dimana isolat tidak maksimal dalam memproduksi lipase karena adanya kompetisi antar spesies.

Pada perlakuan kontrol menunjukkan adanya aktivitas lipase sebesar  $0,0399^a$  U/mL dengan nilai degradasi sebesar  $9,80^a$  %. Perlakuan kontrol merupakan perlakuan tanpa penambahan isolat. Sterilisasi medium menggunakan autoklaf bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme indigenus yang ada di dalam limbah, sehingga tidak ada produksi lipase di dalamnya. Namun adanya nilai pada perlakuan kontrol dapat disebabkan oleh beberapa hal. Pemutusan ikatan ester dari trigliseride menjadi asam lemak dan gliserol tidak hanya dilakukan oleh lipase. Pemutusan ikatan ester dapat dipengaruhi oleh suhu. Semakin tinggi suhu maka produksi asam lemak akan meningkat ( Zhang *et al.*, 2011). Hal ini menunjukkan bahwa adanya asam oleat di dalam medium kontrol bukan dikarenakan lipase yang dihasilkan kapang namun karena pemanasan tinggi saat proses sterilisasi menggunakan autoklaf (suhu  $121^\circ\text{C}$ ).

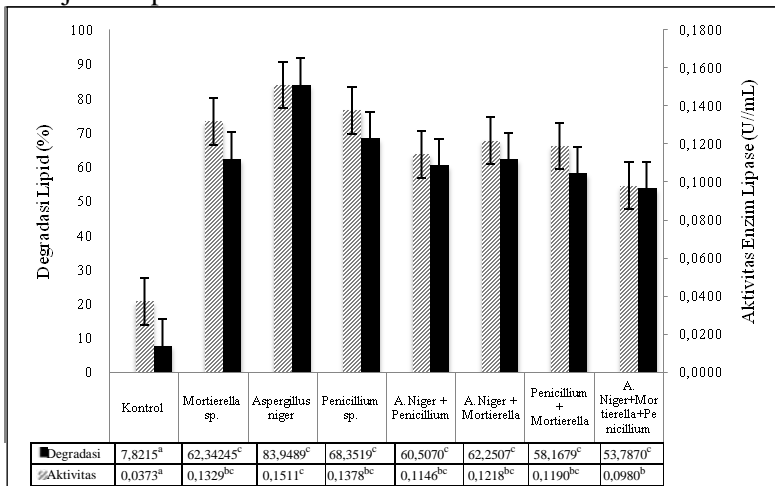
#### **4.2.2Limbah Minyak Goreng Bekas**

Sebagian besar minyak goreng yang telah mengalami suhu tinggi ( $160^\circ\text{--}200^\circ\text{C}$ ) untuk jangka waktu yang relatif lama telah dihasilkan setiap hari di seluruh dunia. Akibatnya minyak mengalami oksidasi asam lemak dan transformasi yang menyebabkan rasa dan bau tidak menyenangkan. Beberapa prosedur telah diusulkan untuk menghilangkan asam lemak bebas guna perpanjangan penggunaan minyak, namun mereka jarang digunakan. Pembuangan limbah polusi semacam ini telah menjadi

masalah yang semakin serius. (Dominguez *et al.*,2010).

Fermentasi minyak goreng tidak dapat dilakukan secara langsung, melainkan perlu diubah menjadi bentuk emulsi dengan penambahan emulsifier berupa Tween 80. Emulsi yang terbentuk tergolong dalam W/O (water in oil) dimana air merupakan fase terdispersi. Beberapa studi menyebutkan bahwa penambahan Tween 80 (15mL/L) menunjukkan dampak positif terhadap produksi lipase oleh *T. atroviride* 676, produksi lipase terus meningkat hingga mencapai 4,76. Perbedaan surfaktan pada produksi lipase dari *Metarhizium anisopliae*, Silva and co-workers (2005) menunjukkan bahwa aktivitas katalitik tertinggi ada pada kultur yang mengandung Tween 80 (4.15 U/ml). (Marquez *et al.* 2014).

Karakteristik limbah minyak goreng bekas memiliki nilai pH 6 dan suhu 32°C dengan jumlah asam lemak sebesar 0,176 $\mu$ mol/mL. Uji degradasi lipid pada limbah minyak goreng bekas dilakukan dengan metode fermentasi cair dengan masa inkubasi selama 7 hari. Hasil aktivitas lipase dan degradasi lipid ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Grafik Aktivitas Lipase dan Degradasi Lipid di dalam Medium Limbah Minyak Goreng Bekas.

Berdasarkan grafik pada gambar 4.5, dapat diketahui bahwa penambahan isolat baik tunggal maupun konsorsium mempengaruhi nilai aktivitas lipase dan degradasi lipid yang dihasilkan pada medium limbah minyak goreng bekas. Hal ini ditunjang dengan analisa data menggunakan ANNOVA *oneway* yang menunjukkan P value sebesar 0,000. Nilai aktivitas tertinggi ditunjukkan pada perlakuan penambahan isolat tunggal, yakni *Aspergillus niger* yang memiliki nilai aktivitas sebesar 0,1511<sup>c</sup> U/mL dengan nilai degradasi sebesar 83,95<sup>c</sup> %. Kedua nilai memiliki taraf signifikansi yang tertinggi yang berarti *A.niger* memiliki nilai yang paling optimal untuk mendegradasi lipid pada medium limbah minyak goreng bekas.

Selanjutnya terdapat lima perlakuan yang memiliki taraf signifikansi yang sama baik pada nilai aktivitas maupun degradasi lipid, yakni isolat *Penicillium* sp. (0,1378<sup>bc</sup> U/mL; 68,35<sup>c</sup> %), isolat *Mortierella* sp. (0,1329<sup>bc</sup> U/mL; 62,34<sup>c</sup> %), konsorsium *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp. (0,0666<sup>bc</sup> U/mL; 18,33<sup>c</sup> %), konsorsium *A. niger* dan *Mortierella* sp (0,1218<sup>bc</sup> U/mL; 62,25<sup>c</sup> %) dan Pada konsorsium *Penicillium* sp. dan *Mortierella* sp. (0,1190<sup>bc</sup> U/mL; 58,17<sup>c</sup> %). Hal ini menunjukkan bahwa produksi lipase dan aktivitas lipase yang dihasilkan dari kelima perlakuan tidak berbeda nyata.

Konsorsium 3 isolat yakni *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* dan *Mortierella* sp. memiliki nilai yang terendah dibandingkan perlakuan yang lain, yakni dengan aktivitas lipase sebesar 0,0980<sup>b</sup> U/mL dan nilai degradasi sebesar 53,78<sup>c</sup> %. Hal ini disebabkan adanya kompetisi interspesifik antara 3 isolat. Rendahnya nilai degradasi menunjukkan produksi lipase yang rendah, dimana isolat tidak maksimal dalam memproduksi lipase dikarenakan kompetisi dan aktivitas dari masing-masing isolat.

Perlakuan kontrol menunjukkan adanya aktivitas lipase sebesar 0,0597<sup>a</sup> U/mL dengan nilai degradasi sebesar 7,82<sup>a</sup> %. Kontrol merupakan perlakuan tanpa penambahan isolat dimana medium telah sterilisasi sehingga tidak ada mikroorganisme indigenus yang ada di dalam limbah. Adanya nilai aktivitas lipase

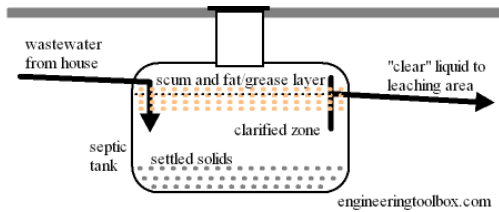
dan degradasi lipid di dalam perlakuan kontrol dapat disebabkan oleh beberapa hal. Salah satunya adalah akibat pemanasan suhu tinggi saat proses sterilisasi, sehingga menyebabkan pemutusan ikatan ester dari trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Hal ini dapat menunjukkan bahwa adanya asam oleat yang terdeteksi saat uji aktivitas enzim dan degradasi lipid bukan diakibatkan oleh enzim lipase.

#### **4.2.3 Limbah tangki septik**

Tangki septik adalah tempat penampungan limbah kotoran manusia (tinja). Walaupun sebagai produk akhir dari proses metabolisme tubuh, tinja manusia masih mengandung sisa nutrisi organik seperti protein, karbohidrat dan lemak. Di dalam tangki septik, bahan organik tersebut akan didegradasi oleh mikroorganisme pengurai menjadi gas dan bahan organik sederhana lainnya. Sedangkan sisa bahan yang tidak dapat diuraikan akan mengendap menjadi lumpur (Firdaus dan Muchlisin, 2010).

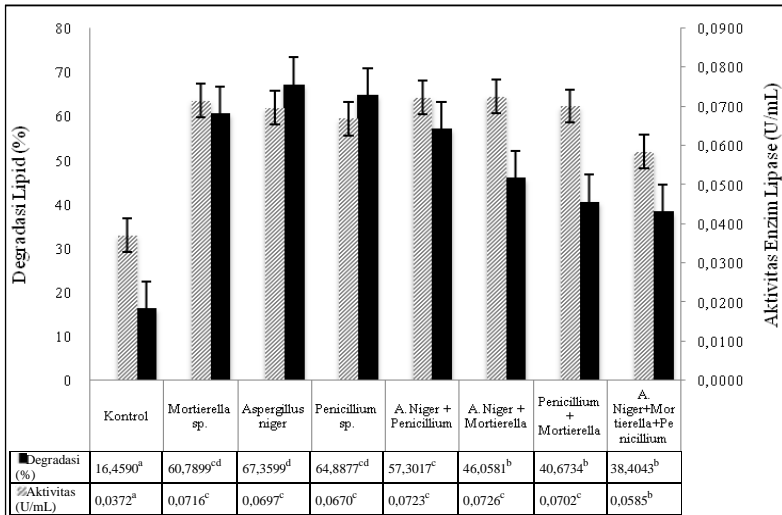
Limbah cair dalam tangki septik juga mengandung lemak pada bagian lapisan atasnya (gambar 4.6). Lemak yang terkandung di dalam limbah digunakan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan kapang dan produksi lipase. Lipase akan mendegradasi lemak dengan memecah lipid menjadi asam lemak dan gliserol pada fase minyak-air.

Lemak yang terkandung di dalam limbah tangki septik terbentuk dalam emulsi minyak di dalam air (*oil in water O/W*), dimana fase minyak sebagai fase terdispersi. Agen pengemulsi pada limbah air tangki septik sebagian besar berupa air sabun pembersihan yang masuk ke dalam badan air tangki septik. Pengambilan limbah tangki septik dilakukan secara hati-hati dengan hanya mengambil bagian atas nya.



Gambar 4.6. Skema Zona Tangki Septik (engineeringtoolbox.com)

Karakteristik limbah pencucian ikan memiliki nilai pH 7 dan suhu  $32^{\circ}\text{C}$  dengan jumlah total asam lemak sebesar  $0,119\mu\text{mol/mL}$ . Adapun hasil fermentasi isolat kapang tanah Wonorejo dalam medium limbah tangki septik dapat dilihat pada gambar 4.7. Berdasarkan grafik yang telah diperoleh, menunjukkan hasil yang berbeda dengan hasil pada limbah pengolahan ikan dan limbah minyak bekas. Dimana nilai aktivitas tertinggi ditunjukkan pada konsorsium dua isolat (*A.niger*+*Mortierella* sp.) namun nilai degradasi tertinggi ditunjukkan pada isolat tunggal (*A. niger*). Hal menunjukkan bahwa jumlah produksi lipase ini tidak selalu linear dengan aktivitas lipase. Hal ini dapat disebabkan oleh faktor pelarut, jumlah zat organik, konsentrasi enzim dan substrat. Pada limbah tangki septik, mengandung zat-zat organik sebesar 20% untuk tinja dan 2,5% untuk air seni (Azwar, 1995). Didalam limbah tangki septik terdapat pula kandungan mikronutrien seperti  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  yang dapat menstimulasi aktivitas. Beberapa hal tersebut yang dapat menyebabkan medium limbah tangki septik menjadi optimum bagi aktivitas lipase dari isolat konsorsium.



Gambar 4.7 Grafik Aktivitas Lipase dan Degradasi Lipid di dalam Medium Limbah Tangki Septik

Berdasarkan grafik pada gambar 4.7, dapat diketahui bahwa penambahan isolat tunggal dan konsorsium mempengaruhi nilai aktivitas lipase dan degradasi lipid yang dihasilkan pada medium limbah tangki septik. Hal ini ditunjang dengan analisa data menggunakan ANNOVA *oneway* yang menunjukkan P value sebesar 0,000. Analisa dilanjutkan dengan menggunakan uji Duncan untuk mengetahui pengaruh dari masing-masing pada taraf signifikansi nya. Semakin besar notasi maka semakin besar pengaruh isolat dalam melakukan aktivitas atau degradasi.

Pada semua isolat tunggal dan konsorsium menunjukkan taraf signifikansi yang sama yakni dengan notasi c. Dimana nilai aktivitas tertinggi ditunjukkan pada konsorsium *Aspergillus niger* dan *Mortierella* sp yang memiliki aktivitas lipase sebesar 0,0726<sup>c</sup> U/mL dan degradasi lipid sebesar 45,06<sup>b</sup> %. Sehingga untuk mengetahui mana isolat yang paling berpengaruh, perlu dikorelasikan dengan nilai degradasi lipid. Nilai degradasi lipid dengan tingkat signifikansi paling besar ditunjukkan pada isolat

tunggal *A. niger* yang memiliki nilai degradasi sebesar 67,36<sup>d</sup> % dengan nilai aktivitas sebesar 0,0697<sup>c</sup> U/mL. Dengan demikian isolat tunggal *A. niger* dapat dikatakan sebagai isolat yang paling optimal di dalam limbah tangki septik.

Pada isolat *Mortierella* sp. (0,0716<sup>c</sup> U/mL; 60,79<sup>cd</sup> %), memiliki taraf signifikansi yang sama dengan *Penicillium* sp. (0,0670<sup>c</sup> U/mL; 64,87<sup>cd</sup> %). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas lipase dari kedua isolat tidak berbeda nyata.

Pada konsorsium *A. niger* dan *Penicillium* sp (0,0723<sup>c</sup> U/mL; 57,30<sup>c</sup> %), memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan konsorsium *Penicillium* sp dan *Mortierella* sp (0,0702<sup>c</sup> U/mL; 40,67<sup>b</sup> %) namun memiliki tingkat signifikansi yang sama yakni dalam notasi c. Setelah dikorelasikan dengan nilai degradasi maka konsorsium dari konsorsium *A. niger* dan *Penicillium* sp lebih berpengaruh dibandingkan dengan konsorsium *Penicillium* sp dan *Mortierella* sp. Hal ini disebabkan pada pertumbuhan tunggal, isolat *A. niger* memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan isolat *Penicillium* sp sehingga produksi lipase lebih banyak pada konsorsium *A. niger* dan *Mortierella* sp.

Konsorsium tiga isolat menunjukkan nilai yang paling rendah dengan nilai aktivitas lipase sebesar 0,0585<sup>b</sup> U/mL dan nilai degradasi lipid sebesar 38,40<sup>b</sup> %. Hal ini disebabkan adanya kompetisi interspesifik. Spesies yang dapat mengeluarkan antifungal yakni *Penicillium* sp. Rendahnya nilai degradasi menunjukkan produksi lipase yang rendah, dimana dengan isolat tidak maksimal dalam memproduksi lipase karena adanya kompetisi antar spesies.

Pada perlakuan kontrol menunjukkan adanya aktivitas lipase sebesar 0,0372<sup>a</sup> U/mL dengan nilai degradasi sebesar 16,46<sup>a</sup> %. Adanya nilai aktivitas lipase dan degradasi lipid di dalam perlakuan kontrol dapat disebabkan oleh beberapa hal. Salah satunya adalah akibat pemanasan suhu tinggi saat proses sterilisasi, sehingga menyebabkan pemutusan ikatan ester dari trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol.



## **BAB V**

### **KESIMPULAN dan SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa penambahan isolat mempengaruhi aktivitas enzim pada masing-masing limbah dengan nilai  $p=0,000$  ( $<0,005$ ) pada uji ANOVA *oneway* dengan rincian sebagai berikut :

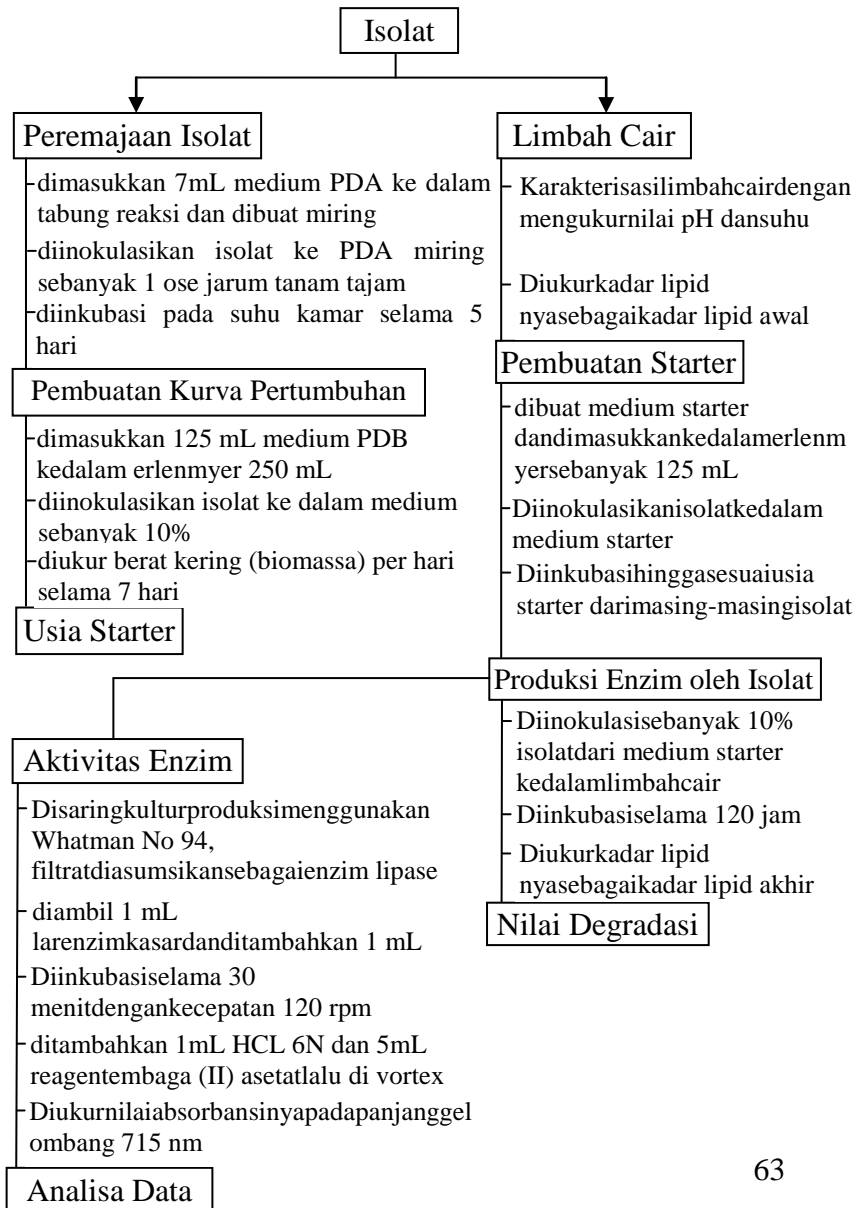
1. Pada medium limbah pencucian ikan menunjukkan bahwa aktivitas lipase yang optimal untuk isolat tunggal yakni *Aspergillus niger* ( $0,0997^c$  U/mL;  $58,43^d$  %) dan untuk konsorsium yakni *Mortierella* sp dan *A. niger* ( $0,0697^{cd}$  U/mL;  $31,31^{abc}$  %).
2. Pada medium limbah minyak goreng bekas menunjukkan bahwa aktivitas lipase yang optimal untuk isolat tunggal yakni *Aspergillus niger* ( $0,1511^c$  U/mL;  $83,95^c$  %) dan untuk konsorsium yakni *Mortierella* sp dan *A. niger* ( $0,1218^{bc}$  U/mL;  $62,25^c$  %).
3. Pada medium limbah tangki septik menunjukkan bahwa aktivitas lipase yang optimal untuk isolat tunggal yakni *Aspergillus niger* ( $0,0697^c$  U/mL;  $67,36^d$  %) dan untuk konsorsium yakni *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp. ( $0,0723^c$  U/mL;  $57,30^c$  %).

#### **5.2 Saran**

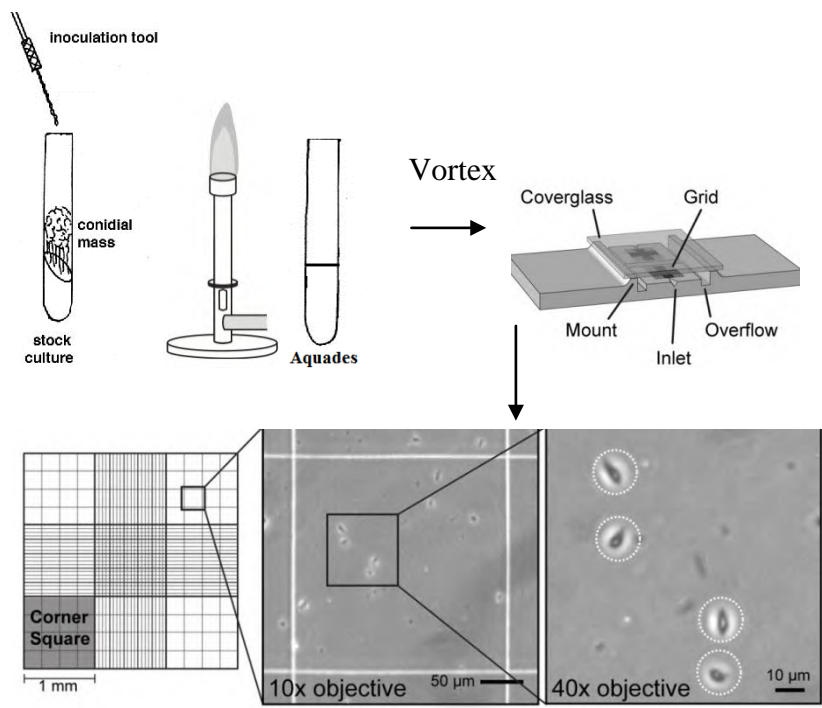
Adapun saran dalam penelitian ini yaitu perlu adanya identifikasi dan karakterisasi enzim lipase, serta aplikasi di lapangan dengan kontrol nutrisi pada agen hayati yang digunakan dalam mendegradasi limbah organik.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## Lampiran1 :SkemaKerja Penelitian

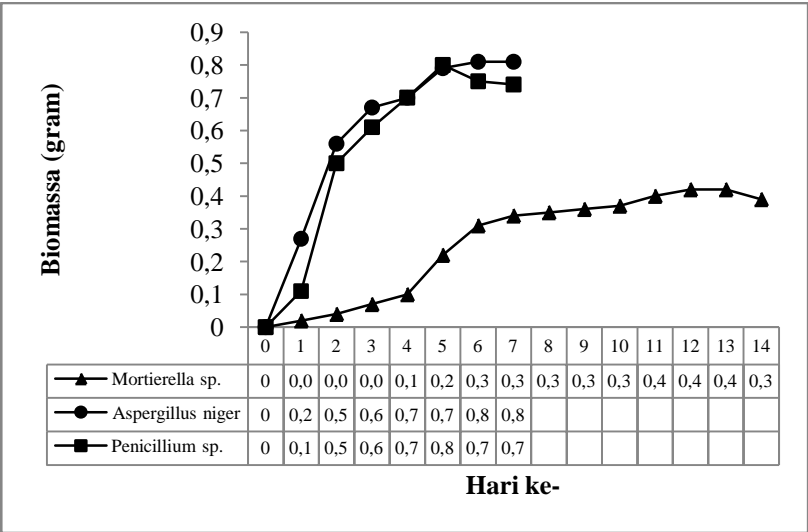


Lampiran 2:MetodePerhitunganSpora

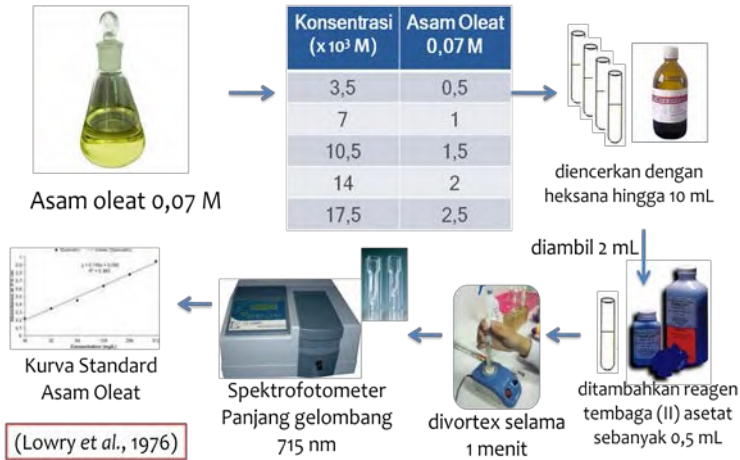


Lampiran3: Biomassa Kurva Pertumbuhan

Hari Ke	Biomassa (gram)		
	<i>Mortierella</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium</i> sp.
1	0,02	0,27	0,11
2	0,04	0,56	0,50
3	0,07	0,67	0,61
4	0,10	0,70	0,70
5	0,22	0,79	0,80
6	0,31	0,81	0,75
7	0,34	0,81	0,74
8	0,35	-	-
9	0,36	-	-
10	0,37	-	-
11	0,40	-	-
12	0,42	-	-
13	0,42	-	-
14	0,39	-	-

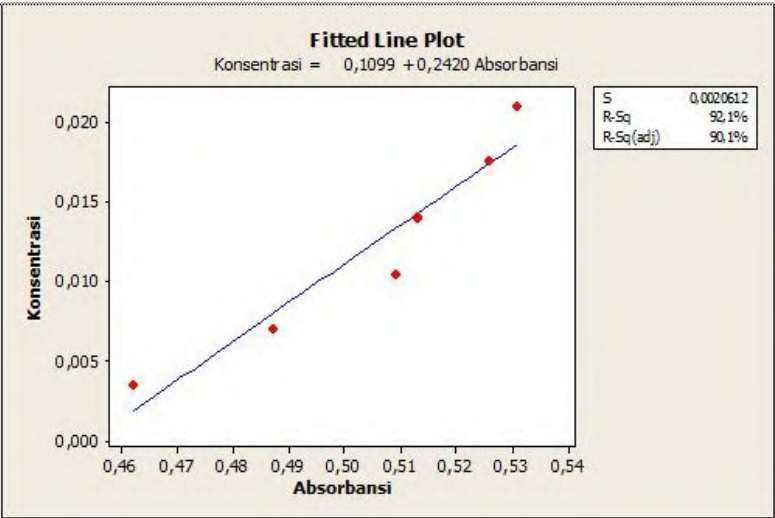


Lampiran4: Kurva Standar Asam Oleat



### Hasil pengukuran standard asam oleat

Konsentrasi	Absorbansi
0,0035	0,462
0,0070	0,487
0,0105	0,509
0,0140	0,513
0,0175	0,526
0,0210	0,531



**Regression Analysis: Konsentrasi versus Absorbansi**

The regression equation is

Konsentrasi = 0,110 + 0,242 Absorbansi

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,10990	0,01794	-6,13	0,004
Absorbansi	0,24204	0,03551	6,82	0,002

S = 0,00206123    R-Sq = 92,1%    R-Sq(adj) = 90,1%

**Analysis of Variance**

Source	DF	SS	MS	F
P				
Regression	1	0,00019738	0,00019738	46,46
Residual Error	4	0,00001699	0,00000425	
Total	5	0,00021438		

### Lampiran 5: Penentuan Aktivitas Lipase

- a. Konsentrasi asam oleat yang terbentuk.

Misalkan, pada kontrol absorbansi yang terukur 0,035

Maka digunakan persamaan dari kurva regresi asam oleat:

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi} &= 0,1099 + 0,242 \text{ Absorbansi} \\ &= 0,1099 + 0,242 * 0,035 \\ &= 0,1099 + 0,00847 \\ &= 0,11839 \mu\text{mol/mL}\end{aligned}$$

- b. Aktivitas Lipase

Setelah diketahui nilai konsentrasi asam oleat yang terbentuk, kemudian nilai tersebut dimasukkan kedalam rumus sebagai berikut :

$$Ae = \frac{\text{konsentrasi Asamoleat } (\mu\text{mol/mL})}{\text{Waktu Inkubasi (menit)}} \times \frac{\text{volume total campuran (mL)}}{\text{volume enzim (mL)}}$$

$$Ae = \frac{0,11839 \mu\text{mol}}{30 \text{ menit}} \times \frac{9,5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$Ae = \frac{1,24705}{30}$$

$$Ae = 0,0374902 \text{ U/mL}$$



## Lampiran 6: Penentuan Degradasi Lipid

### a. Konsentrasi asam oleat awal

Pada kondisi awal, setelah medium disaring

Pada limbah pencucian ikan, absorbansi medium awal adalah 0,273

Maka digunakan persamaan dari kurva regresi asam oleat:

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi} &= 0,1099 + 0,242 \text{ Absorbansi} \\ &= 0,1099 + 0,242 \times 0,273 \\ &= 0,1099 + 0,066066 \\ &= 0,175966 \mu\text{mol/mL}\end{aligned}$$

### b. Konsentrasi asam oleat yang terbentuk

Misalkan, pada kontrol absorbansi yang terukur 0,337

Maka digunakan persamaan dari kurva regresi asam oleat:

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi} &= 0,1099 + 0,242 \text{ Absorbansi} \\ &= 0,1099 + 0,242 \times 0,337 \\ &= 0,1099 + 0,081554 \\ &= 0,191454 \mu\text{mol/mL}\end{aligned}$$

### c. Degradasi lipid

Setelah diketahui nilai konsentrasi asam oleat yang terbentuk, kemudian nilai tersebut dimasukkan kedalam rumus sebagai berikut :

$$\text{Nilai Degradasi} = \frac{(\text{Konsentrasi akhir} - \text{Konsentrasi awal})}{\text{Konsentrasi awal}} \times 100\%$$







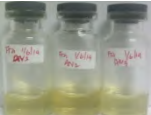











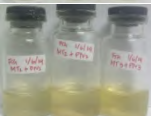

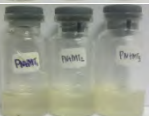



$$\text{Nilai Degradasi} = \frac{(0,191454 - 0,175966)}{0,175966} \times 100\%$$

$$\text{Nilai Degradasi} = \frac{0,015488}{0,175966} \times 100\%$$

$$\text{Nilai Degradasi} = 0,088017 \times 100\%$$

$$\text{Nilai Degradasi} = 8,8017\%$$

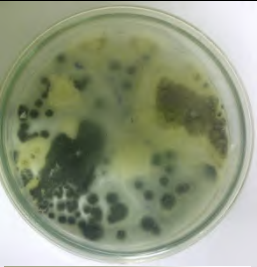
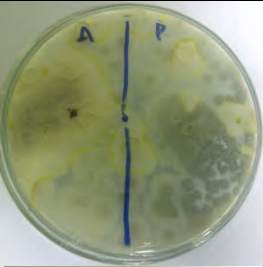
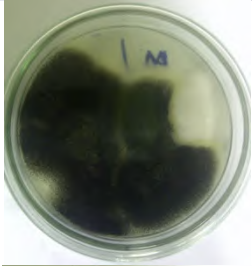
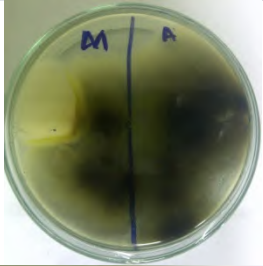
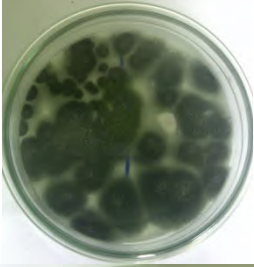

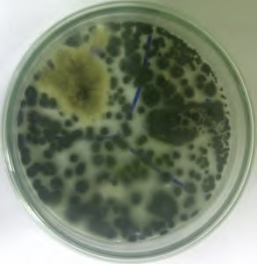
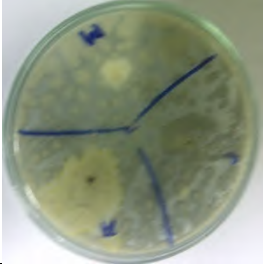
Lampiran 7: Dokumentasi Enzim Lipase

Isolat	Limbah	Limbah Pencucian Ikan	Limbah Minyak Goreng Bekas	Limbah Tangki Septik
Kontrol				
<i>Mortierella</i> sp				
<i>Aspergillus niger</i>				
<i>Penicillium</i> sp				
<i>Penicillium</i> sp dan <i>Aspergillus niger</i>				
<i>Aspergillus niger</i> dan <i>Mortierella</i> sp				
<i>Penicillium</i> sp dan <i>Mortierella</i> sp				
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Mortierella</i> sp dan <i>Penicillium</i> sp				

## Lampiran 8: Hasil Uji Pendahuluan

Perlakuan	Suhu (°C)	pH	Absorbansi (Å)	Konsentrasi (μmol/mL)	Aktivitas Lipase (U/mL)	Rata-rata
Kontrol	32	7	0,092	0,13204	0,01541	0,01024
<i>Penicillium</i> sp.	32	5	0,104	0,13507	0,01576	0,01505
<i>Penicillium</i> sp.	32	5	0,054	0,12297	0,01435	
<i>Penicillium</i> sp.	32	6	0,065	0,12551	0,01464	0,01498
<i>Penicillium</i> sp.	32	6	0,088	0,13126	0,01531	
<i>Penicillium</i> sp.	32	7	0,197	0,15745	0,01837	0,01622
<i>Penicillium</i> sp.	43	7	0,044	0,12061	0,01407	
<i>Penicillium</i> sp.	37	5	0,078	0,12878	0,01502	0,01425
<i>Penicillium</i> sp.	37	5	0,023	0,11553	0,01348	
<i>Penicillium</i> sp.	37	6	0,060	0,12448	0,01452	0,01471
<i>Penicillium</i> sp.	37	6	0,074	0,12775	0,01490	
<i>Penicillium</i> sp.	37	7	0,105	0,13537	0,01579	0,01574
<i>Penicillium</i> sp.	37	7	0,102	0,13452	0,01569	
<i>Penicillium</i> sp.	40	5	0,007	0,11165	0,01303	0,01348
<i>Penicillium</i> sp.	40	5	0,039	0,11940	0,01393	
<i>Penicillium</i> sp.	40	6	0,158	0,14814	0,01728	0,01663
<i>Penicillium</i> sp.	40	6	0,112	0,13694	0,01598	
<i>Penicillium</i> sp.	40	7	0,271	0,17554	0,02048	0,01866
<i>Penicillium</i> sp.	40	7	0,142	0,14432	0,01684	

Lampiran 9: Hasil Uji Interaksi

<div>Isolat</div> <div>Limbah</div>		Tampak Depan	Tampak Belakang
<i>Penicillium</i> sp dan <i>Aspergillus niger</i>			
<i>Aspergillus niger</i> dan <i>Mortierella</i> sp			
<i>Penicillium</i> sp dan <i>Mortierella</i> sp			
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Mortierella</i> sp dan <i>Penicillium</i> sp			

## Lampiran10: Data LimbahPencucianIkan

## Aktivitas Lipase

PerlakuanIsolat	Ulangan	Absorbansi (Å)	Konsentrasi (μmol/mL)	Aktivitas Lipase (U/mL)	Rata- rata
Kontrol	1	0,025	0,1160	0,0367	0,0366
	2	0,021	0,1149	0,0364	
	3	0,024	0,1156	0,0366	
<i>Mortierella</i> sp.	1	0,553	0,2436	0,0771	0,0711
	2	0,664	0,2705	0,0856	
	3	0,206	0,1596	0,0505	
<i>Aspergillusniger</i>	1	0,830	0,3106	0,0984	0,0997
	2	0,875	0,3215	0,1018	
	3	0,836	0,3122	0,0989	
<i>Penicillium</i> sp.	1	0,694	0,2777	0,0879	0,0854
	2	0,467	0,2228	0,0706	
	3	0,822	0,3088	0,0978	
<i>A. Niger</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,415	0,2102	0,0666	0,0666
	2	0,357	0,1962	0,0621	
	3	0,474	0,2245	0,0711	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i>	1	0,484	0,2270	0,0719	0,0697
	2	0,447	0,2181	0,0691	
	3	0,436	0,2154	0,0682	
<i>Penicillium</i> sp + <i>Mortierellasp</i>	1	0,551	0,2431	0,0770	0,0652
	2	0,317	0,1865	0,0591	
	3	0,323	0,1879	0,0595	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,228	0,1650	0,0522	0,0524
	2	0,248	0,1699	0,0538	
	3	0,213	0,1613	0,0511	

## Degradasi Lipid

PerlakuanIsolat	Ulangan	Absorbansi (Å)	Konsentrasi (µmol/mL)	NilaiDegr adasi(%)	Rata-rata
Kontrol	1	0,165	0,1498	15,2663	9,8052
	2	0,131	0,1416	8,9363	
	3	0,111	0,1368	5,2129	
<i>Mortierella</i> sp.	1	0,208	0,1601	23,1787	32,9218
	2	0,338	0,1916	47,3813	
	3	0,235	0,1666	28,2053	
<i>Aspergillusniger</i>	1	0,389	0,2039	56,8761	58,4276
	2	0,381	0,2021	55,4798	
	3	0,421	0,2118	62,9268	
<i>Penicillium</i> sp.	1	0,366	0,1984	52,5941	40,2446
	2	0,309	0,1846	41,9822	
	3	0,224	0,1640	26,1574	
<i>A. Niger</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,153	0,1468	12,9391	18,3381
	2	0,156	0,1475	13,4976	
	3	0,237	0,1671	28,5777	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i>	1	0,227	0,1647	26,7160	31,3082
	2	0,255	0,1715	31,9288	
	3	0,273	0,1758	35,2800	
<i>Penicillium</i> sp + <i>Mortierellasp</i>	1	0,213	0,1613	24,1095	29,6016
	2	0,128	0,1408	8,2847	
	3	0,386	0,2033	56,4107	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,182	0,1538	18,3381	15,8868
	2	0,133	0,1420	9,2156	
	3	0,191	0,1561	20,1068	
Awal		0,083	0,1300	0,0000	0,0000

### Aktivitas Lipase

PerlakuanIsolat	Ulangan	Absorbansi (Å)	Konsentrasi ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Aktivitas Lipase (U/mL)	Rata- rata
Kontrol	1	0,031	0,1174	0,0372	0,0373
	2	0,034	0,1181	0,0374	
	3	0,033	0,1178	0,0373	
<i>Mortierella</i> sp.	1	1,305	0,4257	0,1348	0,1320
	2	1,177	0,3946	0,1250	
	3	1,323	0,4299	0,1361	
<i>Aspergillusniger</i>	1	1,374	0,4424	0,1401	0,1511
	2	1,856	0,5591	0,1770	
	3	1,322	0,4297	0,1361	
<i>Penicillium</i> sp.	1	0,900	0,3276	0,1037	0,1378
	2	1,819	0,5500	0,1742	
	3	1,316	0,4284	0,1357	
<i>A. Niger</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,449	0,2186	0,0692	0,1146
	2	1,334	0,4326	0,1370	
	3	1,343	0,4348	0,1377	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i>	1	0,922	0,3329	0,1054	0,1218
	2	1,230	0,4074	0,1290	
	3	1,253	0,4131	0,1308	
<i>Penicillium</i> sp + <i>Mortierellasp</i>	1	1,177	0,3946	0,1250	0,1190
	2	0,904	0,3287	0,1041	
	3	1,215	0,4038	0,1279	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,835	0,3118	0,0988	0,0980
	2	0,834	0,3117	0,0987	
	3	0,807	0,3051	0,0966	

Degradasi Lipid

PerlakuanIsolat	Ulangan	Absorbansi (Å)	Konsentrasi (μmol/mL)	NilaiDegradasi (%)	Rata-rata
Kontrol	1	0,337	0,1915	8,8766	7,8215
	2	0,374	0,2003	13,8997	
	3	0,278	0,1771	0,6881	
<i>Mortierella</i> sp.	1	0,747	0,2907	80,0955	62,3424
	2	0,607	0,2568	42,2497	
	3	0,954	0,3406	64,6820	
<i>Aspergillusniger</i>	1	1,045	0,3627	106,2436	83,9489
	2	0,757	0,2930	66,6087	
	3	0,847	0,3148	78,9946	
<i>Penicillium</i> sp.	1	0,713	0,2823	65,3013	68,3519
	2	0,947	0,3390	46,0343	
	3	0,678	0,2739	93,7200	
<i>A. Niger</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,780	0,2987	60,5533	60,5075
	2	0,604	0,2561	65,2324	
	3	0,702	0,2797	55,7366	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i>	1	0,855	0,3167	45,8279	62,2507
	2	0,580	0,2501	55,0485	
	3	0,743	0,2896	85,8756	
<i>Penicillium</i> sp + <i>Mortierellasp</i>	1	0,606	0,2564	69,8428	58,1679
	2	0,673	0,2726	45,6214	
	3	0,897	0,3269	59,0395	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,572	0,2482	41,1487	53,7870
	2	0,751	0,2915	65,7829	
	3	0,668	0,2716	54,4292	
Awal		0,273	0,1758	0,0000	0,0000



## Aktivitas Lipase

PerlakuanIsolat	Ulangan	Absorbansi (Å)	Konsentrasi (µmol/mL)	Aktivitas Lipase (U/mL)	Rata-rata
Kontrol	1	0,039	0,1193	0,0378	0,0372
	2	0,028	0,1166	0,0369	
	3	0,026	0,1161	0,0368	
<i>Mortierella</i> sp.	1	0,477	0,2252	0,0713	0,0716
	2	0,489	0,2282	0,0723	
	3	0,474	0,2245	0,0711	
<i>Aspergillusniger</i>	1	0,378	0,2013	0,0637	0,0670
	2	0,378	0,2014	0,0638	
	3	0,504	0,2317	0,0734	
<i>Penicillium</i> sp.	1	0,475	0,2247	0,0712	0,0697
	2	0,415	0,2103	0,0666	
	3	0,478	0,2255	0,0714	
<i>A. Niger</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,472	0,2240	0,0709	0,0723
	2	0,503	0,2315	0,0733	
	3	0,495	0,2296	0,0727	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i>	1	0,582	0,2506	0,0794	0,0726
	2	0,414	0,2100	0,0665	
	3	0,485	0,2271	0,0719	
<i>Penicillium</i> sp + <i>Mortierellasp</i>	1	0,498	0,2303	0,0729	0,0702
	2	0,396	0,2056	0,0651	
	3	0,491	0,2287	0,0724	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,319	0,1870	0,0592	0,0585
	2	0,391	0,2044	0,0647	
	3	0,218	0,1625	0,0515	

## Degradasi Lipid

PerlakuanIsolat	Ulangan	Absorbansi (Å)	Konsentrasi (μmol/mL)	NilaiDegr adasi (%)	Rata- rata
Kontrol	1	0,137	0,1429	20,0149	16,4590
	2	0,119	0,1386	16,3574	
	3	0,102	0,1346	13,0046	
<i>Mortierella</i> sp.	1	0,332	0,1901	59,6384	60,7899
	2	0,348	0,1941	62,9912	
	3	0,332	0,1902	59,7400	
<i>Aspergillusniger</i>	1	0,299	0,1821	61,6704	64,8877
	2	0,327	0,1889	60,6544	
	3	0,335	0,1910	72,3383	
<i>Penicillium</i> sp.	1	0,286	0,1790	70,0015	67,3599
	2	0,277	0,1768	71,9319	
	3	0,232	0,1660	60,1464	
<i>A. Niger</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,342	0,1925	52,9329	57,3017
	2	0,337	0,1913	58,6225	
	3	0,394	0,2052	60,3496	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i>	1	0,383	0,2025	50,2914	46,0581
	2	0,392	0,2048	48,4626	
	3	0,334	0,1907	39,4203	
<i>Penicillium</i> sp + <i>Mortierellasp</i>	1	0,229	0,1652	38,7091	40,6734
	2	0,226	0,1646	38,2011	
	3	0,260	0,1728	45,1098	
<i>A. Niger</i> + <i>Mortierellasp</i> + <i>Penicillium</i> sp	1	0,232	0,1660	39,4203	38,4043
	2	0,212	0,1612	35,3564	
	3	0,237	0,1673	40,4363	
Awal		0,038	0,1191	0,0000	

### Lampiran 13 : Analisa Data Aktivitas Lipase pada Limbah Pencucian Ikan

#### a. Uji Anova *Oneway*

ANOVA					
Aktivitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.008	7	.001	13.323	.000
Within Groups	.001	16	.000		
Total	.009	23			

#### b. Uji Duncan

##### Aktivitas

##### Duncan

Medium	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
1	3	.036564				
8	3		.052376			
6	3		.065187	.065187		
5	3		.066592	.066592		
7	3			.069721	.069721	
2	3			.071113	.071113	
4	3				.085431	.085431
3	3					.099685
Sig.		1.000	.087	.473	.060	.072

# Lampiran 14 : Analisa Data Degradasi Lipid pada Limbah Pencucian Ikan

## a. Uji Anova *Oneway*

ANOVA					
Degradasi					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4994.988	7	713.570	5.121	.003
Within Groups	2229.534	16	139.346		
Total	7224.522	23			

## b. Uji Duncan

### Degradasi

#### Duncan

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	9.805159E0			
8	3	1.588684E1	1.588684E1		
5	3	1.833813E1	1.833813E1	1.833813E1	
7	3	2.960165E1	2.960165E1	2.960165E1	
6	3	3.130824E1	3.130824E1	3.130824E1	
2	3		3.292175E1	3.292175E1	
4	3			4.024459E1	4.024459E1
3	3				5.842758E1
Sig.		.060	.129	.055	.078

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 15 : Analisa Data Aktivitas Lipase pada Limbah Minyak Goreng Bekas

a. Uji Anova *Oneway*

ANOVA					
Aktivitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.025	7	.004	7.849	.000
Within Groups	.007	16	.000		
Total	.033	23			

b. Uji Duncan

Duncan

Medium	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	3	.037292		
8	3		.098024	
5	3		.114628	.114628
7	3		.118971	.118971
6	3		.121755	.121755
2	3		.131973	.131973
4	3		.137848	.137848
3	3			.151067
Sig.		1.000	.059	.082

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 16 : Analisa DataAktivitas Lipase pada Limbah Minyak Goreng Bekas

a.Uji Anova *Oneway*

ANOVA					
Degradasi					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10060.696	7	1437.242	5.336	.003
Within Groups	4309.839	16	269.365		
Total	14370.535	23			

b.Uji Duncan

Degradasi			
Duncan			
Isolat	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	7.821471	
8	3		5.378695E1
7	3		5.816790E1
5	3		6.050746E1
6	3		6.225066E1
2	3		6.234240E1
4	3		6.835186E1
3	3		8.394894E1
Sig.		1.000	.063

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 17 : Analisa Data Aktivitas Lipase pada Limbah  
Tangki Septik

a. Uji Anova *Oneway*

ANOVA					
Aktivitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	7	.000	32.628	.000
Within Groups	.000	16	.000		
Total	.003	23			

b. Uji Duncan

Duncan

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	3	.037152	.058469	
8	3			
3	3			
4	3			.069721
7	3			.070155
2	3			.071560
6	3			.072314
5	3			.072595
Sig.		1.000	1.000	.168

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 18 : Analisa Data Degradasi Lipid pada Limbah Tangki Septik

a. Uji Anova *Oneway*

ANOVA					
Degradasi					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6034.625	7	862.089	40.175	.000
Within Groups	343.333	16	21.458		
Total	6377.958	23			

b. Uji Duncan

Degradasi					
Duncan					
Isolat	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	1.633333E1			
8	3		3.800000E1		
7	3		4.033333E1		
6	3		4.566667E1		
5	3			5.666667E1	
2	3			6.000000E1	6.000000E1
4	3			6.433333E1	6.433333E1
3	3				6.700000E1
Sig.		1.000	.071	.071	.097

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



### Lampiran 19 : Hasil Pengukuran pH dan Suhu Limbah

#### a. Karakterisasi Limbah Organik

Limbah	Pencucian Ikan	Minyak Goreng Bekas	Tangki Septik
pH	7	6	7
Suhu	32	32	32

#### b. Hasil pengukuran pH medium awal dan akhir inkubasi

Isolat	Limbah Pencucian Ikan		Limbah Minyak Goreng Bekas		Limbah Tangki Septik	
	Awal	Akhir	Awal	Akhir	Awal	Akhir
Kontrol	7	7	7	6	7	6
<i>Aspergillus niger</i>	7	6	7	5	7	6
<i>Mortierella</i> sp.	7	7	7	6	7	6
<i>Penicillium</i> sp.	7	6	7	5	7	6
<i>Aspergillus niger</i> + <i>Penicillium</i> sp.	7	6	7	5	7	6
<i>Aspergillus niger</i> + <i>Mortierella</i> sp.	7	7	7	5	7	6
<i>Penicillium</i> sp. + <i>Mortierella</i> sp.	7	7	7	6	7	6
<i>Aspergillus niger</i> + <i>Mortierella</i> sp.+ <i>Penicillium</i> sp.	7	7	7	6	7	6

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”.**

## Lampiran : Biodata Penulis

**BIODATA PENULIS**

Penulis yang memiliki nama lengkap Alfia Rahma Kurniawati ini dilahirkan di Surabaya pada tanggal 19 Maret 1992. Penulis merupakan anak ke-2 dari dua bersaudara. Pendidikan formal yang telah ditempuh penulis yaitu pada SD Muhammadiyah 18 Surabaya tahun 1998-2004, MTs YKUI Maskumambang Gresik tahun 2004-2007, SMK Farmasi Surabaya tahun 2007-2010, hingga pada tahun 2010 penulis diterima di Jurusan Biologi ITS melalui PMDK Bidikmisi dan terdaftar sebagai mahasiswa dengan NRP 1510 100 020. Penulis sempat aktif didalam organisasi mahasiswa HIMABITS periode kepengurusan 2008/2009 dan 2009/2010. Kalimat nasehat yang selalu coba penulis pegang adalah “Khoirunnas anfauhum linnaas” yang mempunyai makna untuk selalu memberikan manfaat bagi sesama. Penulis dapat dihubungi melalui surat elektronik pada [alfia.kurniawati@gmail.com](mailto:alfia.kurniawati@gmail.com)